

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2003-510290

(P2003-510290A)

(43) 公表日 平成15年3月18日 (2003.3.18)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
A 6 1 K 38/21		A 6 1 K 31/7088	4 B 0 6 5
31/7088		35/12	4 C 0 8 4
35/12		A 6 1 P 1/00	4 C 0 8 6
38/00		1/08	4 C 0 8 7
A 6 1 P 1/00		1/16	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 197 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2001-526199(P2001-526199)
 (86) (22) 出願日 平成12年9月27日 (2000.9.27)
 (85) 翻訳文提出日 平成14年3月27日 (2002.3.27)
 (86) 国際出願番号 P C T / U S 0 0 / 2 6 5 2 7
 (87) 国際公開番号 W O 0 1 / 0 2 2 9 9 0
 (87) 国際公開日 平成13年4月5日 (2001.4.5)
 (31) 優先権主張番号 6 0 / 1 5 6 , 1 4 7
 (32) 優先日 平成11年9月27日 (1999.9.27)
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)

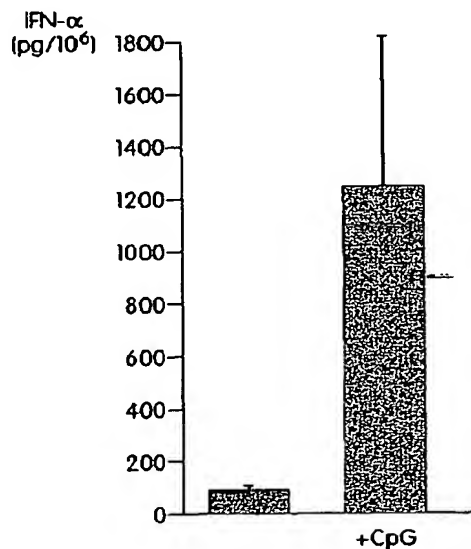
(71) 出願人 コーリー ファーマシューティカル グループ, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ
 02481, ウェルズリー, スイート 115,
 ウィリアム ストリート 20
 (71) 出願人 ユニバーシティ オブ アイオワ リサーチ
 ファウンデーション
 アメリカ合衆国 アイオワ 52242-5000,
 アイオワ シティ, テクノロジー イノベ
 イション センター 214
 (74) 代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫刺激核酸誘導インターフェロンに関する方法

(57) 【要約】

方法および組成物は、種々のウイルス性障害および増殖性障害の処置において I F N - α の臨床的利用を広げるために提供される。他の局面中で、本発明は、I F N - α 処置の効力を増強し、そして I F N - α 処置に関連する副作用を減少する方法を提供する。さらに、方法は、インビトロで外因性の I L - 3 または G M - C S F なしに、天然インターフェロン産生細胞 (I P S) の生存を支えるため、および天然インターフェロン産生細胞を活性化するため提供される。本発明は、特定の C p G および非 C p G I S N A が、I P C の生存および刺激を促進するという知見に基づく。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 IFN- α の投与を要する方法において、単離された免疫刺激核酸の有効量を共投与する工程を包含する改良。

【請求項2】 前記IFN- α が、IFN- α 単独について臨床的に確立された有効用量未満の用量で投与される、請求項1に記載の改良。

【請求項3】 前記IFN- α が、IFN- α について前記核酸の非存在下で最大に許容される用量で投与される、請求項1に記載の改良。

【請求項4】 前記IFN- α が、IFN- α について被験体において最大に許容される用量よりも少なくとも20%少なくで投与される、請求項1に記載の改良。

【請求項5】 前記IFN- α が、IFN- α について被験体において最大に許容される用量よりも少なくとも30%少なくで投与される、請求項1に記載の改良。

【請求項6】 前記IFN- α が、IFN- α について被験体において最大に許容される用量よりも少なくとも40%少なくで投与される、請求項1に記載の改良。

【請求項7】 前記IFN- α が、IFN- α について被験体において最大に許容される用量よりも少なくとも50%少なくで投与される、請求項1に記載の改良。

【請求項8】 前記免疫刺激核酸が、改変されたものである、請求項1に記載の改良。

【請求項9】 前記免疫刺激核酸が、以下：
ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、メチルホスホネート、およびペプチド
からなる群より選択される少なくとも1つのヌクレアーゼ耐性ヌクレオチド間結合を有する骨格を含む、請求項1に記載の改良。

【請求項10】 前記免疫刺激核酸が、少なくとも1つのヌクレオチドアナログまたはヌクレオチド誘導体を含む、請求項1に記載の改良。

【請求項11】 前記免疫刺激核酸が、パリンδροームでない、請求項1に

記載の改良。

【請求項12】 前記免疫刺激核酸が、CpG核酸である、請求項1に記載の改良。

【請求項13】 前記免疫刺激核酸が、非CpG核酸である、請求項1に記載の改良。

【請求項14】 前記非CpG免疫刺激核酸が、トリッチ核酸である、請求項13に記載の改良。

【請求項15】 前記非CpG免疫刺激核酸が、ポリG核酸である、請求項13に記載の改良。

【請求項16】 前記免疫刺激核酸が、以下：
CpG核酸、トリッチ核酸、およびポリG核酸
からなる群より選択される少なくとも2つの核酸の任意の組み合わせである、請求項1に記載の改良。

【請求項17】 前記免疫刺激核酸が、8と100との間のヌクレオチド長である、請求項1に記載の改良。

【請求項18】 前記免疫刺激核酸が、12と40との間のヌクレオチド長である、請求項1に記載の改良。

【請求項19】 請求項1に記載の改良であって、ここで前記免疫刺激核酸が、以下：

【化1】

ggGGTCAACGTTGAgggggG	ODN 1585	配列番号1
tcgtcgtttgcgttttgcgtt	ODN 2022	配列番号2
ggggcgtcgttttggggg	ODN 2184	配列番号3
tcgtcgtttgcgttttggggg	ODN 2185	配列番号4
ggggcgcgcgcgcgggggg	ODN 2192	配列番号5
ggggcatcgatgagggggg	ODN 2204	配列番号6
ggGGGACGATCGTCgggggG	ODN 2216	配列番号7
gggggtcgtacgacggggg	ODN 2217	配列番号8
ggGGGACGATATCGTCgggggG	ODN 2245	配列番号9
ggGGGACGACGTCGTCgggggG	ODN 2246	配列番号10
ggGGGACGAGCTCGTCgggggG	ODN 2247	配列番号11
ggGGGACGTACGTCgggggG	ODN 2248	配列番号12
ggGGGACGATCGTTGggggG	ODN 2252	配列番号13
ggGGAACGATCGTCgggggG	ODN 2253	配列番号14
ggGGGACGATCGTCgggggG	ODN 2254	配列番号15
ggGGGACGATCGTCgggggG	ODN 2255	配列番号16
ggGGGTCATCGATGAgggggG	ODN 2260	配列番号17
ggGGTCGTCGACGAgggggG	ODN 2293	配列番号18
ggGGTCGTTTCGAACGAgggggG	ODN 2294	配列番号19
ggGGACGTTTCGAACGTgggggG	ODN 2295	配列番号20
ggGGAACGACGTCGTTgggggG	ODN 2297	配列番号21
ggGGAACGTACGTCgggggG	ODN 2298	配列番号22
ggGGAACGTACGTACGTTgggggG	ODN 2299	配列番号23
ggGGTCACCGGTGAgggggG	ODN 2300	配列番号24
ggGGTCGACGTACGTCGAgggggG	ODN 2301	配列番号25
ggGGACCGGTACCGGTgggggG	ODN 2302	配列番号26
ggGTCGACGTGAgggggG	ODN 2303	配列番号27
ggGGTCGACGTGAgggggG	ODN 2304	配列番号28
ggGGAACGTTAACGTTgggggG	ODN 2305	配列番号29
ggGGACGTGACGTgggggG	ODN 2306	配列番号30
ggGGGTCGTTTCGTTgggggG	ODN 2311	配列番号31
ggGACGATCGTCGgggggG	ODN 2328	配列番号32
ggGTCGTCGACGAgggggG	ODN 2329	配列番号33
ggTCGTCGACGAGgggggG	ODN 2330	配列番号34
ggGGACGATCGTCGgggggG	ODN 2332	配列番号35
ggGGTCGACGTCGACGTCGAgggggG	ODN 2334	配列番号36、および
ggGGACGACGTCGTCGgggggG	ODN 2336	配列番号37、

からなる群より選択される配列を有し、

ここで各小文字が、ホスホロチオエート結合を示し、そして各大文字が、ホスホジエステル結合を示す、

改良。

【請求項20】 被験体にGM-CSFを共投与する工程をさらに包含する、請求項1に記載の改良。

【請求項21】 被験体が、増殖性障害およびウイルス性感染からなる群より選択される状態を有する、請求項1に記載の改良。

【請求項22】 請求項1に記載の改良であって、ここで、被験体が、以下

毛様細胞性白血病、慢性骨髄性白血病、皮膚T細胞白血病、多発性骨髄腫、濾胞性リンパ腫、悪性黒色腫、扁平上皮癌、AIDS関連カポジ肉腫、腎細胞癌、前立腺癌、膀胱細胞癌、子宮頸部形成異常、および結腸癌からなる群より選択される増殖性障害を有する、改良。

【請求項23】 請求項1に記載の改良であって、ここで、被験体が、以下：

B型肝炎、C型肝炎、尖圭コンジローム、ヒト免疫不全ウイルス、ヘルペス、サイトメガロウイルス、エプスタインバーウイルス、およびパピローマウイルスからなる群より選択されるウイルス性障害を有する、改良。

【請求項24】 IFN- α および単離された免疫刺激核酸の有効用量をIFN- α 処置の必要な被験体に投与する工程を包含する、被験体のIFN- α 処置を補う方法。

【請求項25】 前記IFN- α が、IFN- α 単独について臨床的に確立された有効用量未満の用量で投与される、請求項24に記載の方法。

【請求項26】 前記IFN- α が、IFN- α について前記免疫刺激核酸の非存在下で最大に許容される用量で投与される、請求項24に記載の方法。

【請求項27】 前記IFN- α が、IFN- α について前記被験体において最大に許容される用量よりも少なくとも20%少なくで投与される、請求項24に記載の方法。

【請求項28】 前記IFN- α が、IFN- α について前記被験体において最大に許容される用量よりも少なくとも30%少なくで投与される、請求項24に記載の方法。

【請求項29】 前記IFN- α が、IFN- α について前記被験体において最大に許容される用量よりも少なくとも40%少なくで投与される、請求項24に記載の方法。

【請求項30】 前記IFN- α が、IFN- α について前記被験体において最大に許容される用量よりも少なくとも50%少なくで投与される、請求項24に記載の方法。

【請求項31】 前記免疫刺激核酸が、改変されたものである、請求項24

に記載の方法。

【請求項32】 前記免疫刺激核酸が、以下：
ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、メチルホスホネート、およびペプチド
からなる群より選択される少なくとも1つのヌクレアーゼ耐性ヌクレオチド間結合を有する骨格を含む、請求項24に記載の方法。

【請求項33】 前記免疫刺激核酸が、少なくとも1つのヌクレオチドアナログまたはヌクレオチド誘導体を含む、請求項24に記載の方法。

【請求項34】 前記免疫刺激核酸が、パリンドロームでない、請求項24に記載の方法。

【請求項35】 前記免疫刺激核酸が、CpG核酸である、請求項24に記載の方法。

【請求項36】 前記免疫刺激核酸が、非CpG核酸である、請求項24に記載の方法。

【請求項37】 前記非CpG免疫刺激核酸が、トリッチ核酸である、請求項36に記載の方法。

【請求項38】 前記非CpG免疫刺激核酸が、ポリG核酸である、請求項36に記載の方法。

【請求項39】 前記免疫刺激核酸が、以下：
CpG核酸、トリッチ核酸、およびポリG核酸
からなる群より選択される少なくとも2つの核酸の任意の組み合わせである、請求項24に記載の方法。

【請求項40】 前記免疫刺激核酸が、8と100との間のヌクレオチド長である、請求項24に記載の方法。

【請求項41】 前記免疫刺激核酸が、12と40との間のヌクレオチド長である、請求項24に記載の方法。

【請求項42】 請求項24に記載の方法であって、ここで前記免疫刺激核酸が、以下：

【化2】

ggGGTCAACGTTGAgggggG	ODN 1585	配列番号1
tcgtcgttttgcgttttgcgtt	ODN 2022	配列番号2
ggggcgtcgttttggggg	ODN 2184	配列番号3
tcgtcgttttgcgttttggggg	ODN 2185	配列番号4
ggggcgcacgtcgagggggg	ODN 2192	配列番号5
ggggcgcacgtcgagggggg	ODN 2204	配列番号6
ggGGGACGATCGTCgggggG	ODN 2216	配列番号7
gggggctgtacgacggggg	ODN 2217	配列番号8
ggGGGACGATATCGTCgggggG	ODN 2245	配列番号9
ggGGGACGACGTCGTCgggggG	ODN 2246	配列番号10
ggGGGACGAGCTCGTCgggggG	ODN 2247	配列番号11
ggGGGACGTACGTCgggggG	ODN 2248	配列番号12
ggGGGACGATCGTTGggggG	ODN 2252	配列番号13
ggGGAACGATCGTCgggggG	ODN 2253	配列番号14
ggGGGACGATCGTCgggggG	ODN 2254	配列番号15
ggGGGACGATCGTCgggggG	ODN 2255	配列番号16
ggGGGTCATCGATGAgggggG	ODN 2260	配列番号17
ggGGTCGTTCGACGAgggggG	ODN 2293	配列番号18
ggGGTCGTTCGAAACGAgggggG	ODN 2294	配列番号19
ggGGACGTTCGAAACGTgggggG	ODN 2295	配列番号20
ggGGAACGACGTCGTTgggggG	ODN 2297	配列番号21
ggGGAACGTACGTCgggggG	ODN 2298	配列番号22
ggGGAACGTACGTACGTTgggggG	ODN 2299	配列番号23
ggGGTCACCGGTGAgggggG	ODN 2300	配列番号24
ggGGTCGACGTACGTGAgggggG	ODN 2301	配列番号25
ggGGACCGGTACCGGTgggggG	ODN 2302	配列番号26
ggGTCGACGTGAgggggG	ODN 2303	配列番号27
ggGGTCGACGTGAggggg	ODN 2304	配列番号28
ggGGAACGTAAACGTTgggggG	ODN 2305	配列番号29
ggGGACGTGACGTgggggG	ODN 2306	配列番号30
ggGGGTCGTTCGTTgggggG	ODN 2311	配列番号31
ggGACGATCGTCgggggG	ODN 2328	配列番号32
ggGTCGTGACGAggggggG	ODN 2329	配列番号33
ggTCGTGACGAGgggggG	ODN 2330	配列番号34
ggGGACGATCGTCgggggG	ODN 2332	配列番号35
ggGGTCGACGTGACGTGAgggggG	ODN 2334	配列番号36、および
ggGGACGACGTGTCGTgggggG	ODN 2336	配列番号37、

からなる群より選択される配列を有し、

ここで各小文字が、ホスホロチオエート結合を示し、そして各大文字が、ホスホジエステル結合を示す、

方法。

【請求項43】 前記被験体にGM-CSFを共投与する工程をさらに包含する、請求項24に記載の方法。

【請求項44】 前記被験体が、増殖性障害およびウイルス性感染からなる群より選択される状態を有する、請求項24に記載の方法。

【請求項45】 請求項24に記載の方法であって、ここで、前記被験体が、以下：

毛様細胞性白血病、慢性骨髄性白血病、皮膚T細胞白血病、多発性骨髄腫、濾胞性リンパ腫、悪性黒色腫、扁平上皮癌、AIDS関連カポジ肉腫、腎細胞癌、前立腺癌、膀胱細胞癌、子宮頸部形成異常、および結腸癌からなる群より選択される増殖性障害を有する、方法。

【請求項46】 請求項24に記載の方法であって、ここで、前記被験体が、以下：

B型肝炎、C型肝炎、尖圭コンジローム、ヒト免疫不全ウイルス、ヘルペス、サイトメガロウイルス、エプスタイン-バーウイルス、およびパピローマウイルスからなる群より選択されるウイルス性障害を有する、方法。

【請求項47】 被験体のインターフェロン産生細胞（IPC）を活性化するように、該被験体を処置する方法であって、該方法は、以下：

このような処置を必要とする被験体からIPCを単離する工程、
インビトロで該IPCを培養する工程、
インビトロで該IPCを、単離された免疫刺激核酸の有効量と接触させる工程、
および
接触させた該IPCを該被験体へ戻す工程、
を包含する、方法。

【請求項48】 前記IPCをインビトロで成長因子と接触させる工程をさらに包含する、請求項47に記載の方法。

【請求項49】 前記IPCをインビトロでIL-3と接触させる工程をさらに包含する、請求項47に記載の方法。

【請求項50】 前記IPCをインビトロでGM-CSFと接触させる工程をさらに包含する、請求項47に記載の方法。

【請求項51】 前記IPCが、インビトロでIL-3の非存在下で培養される、請求項47に記載の方法。

【請求項52】 前記IPCが、インビトロでGM-CSFの非存在下で培養される、請求項47に記載の方法。

【請求項53】 前記免疫刺激核酸が、改変されたものである、請求項47に記載の方法。

【請求項54】 前記免疫刺激核酸が、以下：
ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、メチルホスホネート、およびペプチド
からなる群より選択される少なくとも1つのヌクレアーゼ耐性ヌクレオチド間結合を有する骨格を含む、請求項47に記載の方法。

【請求項55】 前記免疫刺激核酸が、少なくとも1つのヌクレオチドアナログまたはヌクレオチド誘導体を含む、請求項47に記載の方法。

【請求項56】 前記免疫刺激核酸が、パリンドロームでない、請求項47に記載の方法。

【請求項57】 前記免疫刺激核酸が、CpG核酸である、請求項47に記載の方法。

【請求項58】 前記免疫刺激核酸が、非CpG核酸である、請求項47に記載の方法。

【請求項59】 前記非CpG免疫刺激核酸が、トリッチ核酸である、請求項58に記載の方法。

【請求項60】 前記非CpG免疫刺激核酸が、ポリG核酸である、請求項58に記載の方法。

【請求項61】 前記免疫刺激核酸が、以下：
CpG核酸、トリッチ核酸、およびポリG核酸
からなる群より選択される少なくとも2つの核酸の任意の組み合わせである、請求項47に記載の方法。

【請求項62】 前記免疫刺激核酸が、8と100との間のヌクレオチド長である、請求項47に記載の方法。

【請求項63】 前記免疫刺激核酸が、12と40との間のヌクレオチド長である、請求項47に記載の方法。

【請求項64】 請求項47に記載の方法であって、ここで前記免疫刺激核酸が、以下：

【化3】

ggGGTCAACGTTGAgggggG	ODN 1585	配列番号1
tcgtcgtttgcgttttgcgtt	ODN 2022	配列番号2
ggggtcgtcgtttggggg	ODN 2184	配列番号3
tcgtcgtttgcgttttggggg	ODN 2185	配列番号4
ggggtcgacgtcgagggggg	ODN 2192	配列番号5
ggggtcacgaagggggg	ODN 2204	配列番号6
ggGGGACGATCGTCgggggG	ODN 2216	配列番号7
gggggtcgacgacggggg	ODN 2217	配列番号8
ggGGGACGATATCGTCgggggG	ODN 2245	配列番号9
ggGGGACGACGTCGTCgggggG	ODN 2246	配列番号10
ggGGGACGAGCTCGTCgggggG	ODN 2247	配列番号11
ggGGGACGTACGTCgggggG	ODN 2248	配列番号12
ggGGGACGATCGTTGggggG	ODN 2252	配列番号13
ggGGAACGATCGTCgggggG	ODN 2253	配列番号14
ggGGGACGATCGTCgggggG	ODN 2254	配列番号15
ggGGGACGATCGTCgggggG	ODN 2255	配列番号16
ggGGGTCATCGATGAgggggG	ODN 2260	配列番号17
ggGGTCGTCGACGAgggggG	ODN 2293	配列番号18
ggGGTCGTTTGAACGAgggggG	ODN 2294	配列番号19
ggGGACGTTTGAACGTgggggG	ODN 2295	配列番号20
ggGGAACGACGTCGTTgggggG	ODN 2297	配列番号21
ggGGAACGTACGTCgggggG	ODN 2298	配列番号22
ggGGAACGTACGTACGTTgggggG	ODN 2299	配列番号23
ggGGTCACCGGTGAgggggG	ODN 2300	配列番号24
ggGGTCGACGTACGTCGAgggggG	ODN 2301	配列番号25
ggGGACCGGTACCGGTgggggG	ODN 2302	配列番号26
ggGTCGACGTGAgggggG	ODN 2303	配列番号27
ggGGTCGACGTGAgggg	ODN 2304	配列番号28
ggGGAACGTAAACGTTgggggG	ODN 2305	配列番号29
ggGGACGTGACGTggggG	ODN 2306	配列番号30
ggGGGTCGTTTCGTTgggggG	ODN 2311	配列番号31
ggGACGATCGTCGgggggG	ODN 2328	配列番号32
ggGTCGTCGACGAggggggG	ODN 2329	配列番号33
ggTCGTCGACGAggggggG	ODN 2330	配列番号34
ggGGACGATCGTCGgggggG	ODN 2332	配列番号35
ggGGTCGACGTGACGTGAgggggG	ODN 2334	配列番号36、および
ggGGACGACGTGTCGTTgggggG	ODN 2336	配列番号37、

からなる群より選択される配列を有し、

ここで各小文字が、ホスホロチオエート結合を示し、そして各大文字が、ホスホジエステル結合を示す、

方法。

【請求項65】 被験体のIFN- α 処置の効力を増強する方法であって、ここで、該方法が、以下：

IFN- α での処置を必要とする被験体に対して、IFN- α を含む薬学的組成物を投与する工程、および

そのような処置を必要とする該被験体に、該投与されるIFN- α と一緒にときに有効なIFN- α 処置である量で免疫刺激核酸を含む薬学的組成物を共投与

する工程、を包含する方法であって、ここで該IFN- α 処置の該効力が、該免疫刺激核酸を共投与する工程なしに同量のIFN- α を投与する工程の効力よりも大きい、

方法。

【請求項66】 前記免疫刺激核酸を含む薬学的組成物が、局所的に投与される、請求項65に記載の方法。

【請求項67】 前記免疫刺激核酸が、改変されたものである、請求項65に記載の方法。

【請求項68】 前記免疫刺激核酸が、以下：
ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、メチルホスホネート、およびペプチド
からなる群より選択される少なくとも1つのヌクレアーゼ耐性ヌクレオチド間結合を有する骨格を含む、請求項65に記載の方法。

【請求項69】 前記免疫刺激核酸が、少なくとも1つのヌクレオチドアナログまたはヌクレオチド誘導体を含む、請求項65に記載の方法。

【請求項70】 前記免疫刺激核酸が、パリンδροームでない、請求項65に記載の方法。

【請求項71】 前記免疫刺激核酸が、CpG核酸である、請求項65に記載の方法。

【請求項72】 前記免疫刺激核酸が、非CpG核酸である、請求項65に記載の方法。

【請求項73】 前記非CpG免疫刺激核酸が、トリッチ核酸である、請求項72に記載の方法。

【請求項74】 前記非CpG免疫刺激核酸が、ポリG核酸である、請求項72に記載の方法。

【請求項75】 前記免疫刺激核酸が、以下：
CpG核酸、トリッチ核酸、およびポリG核酸
からなる群より選択される少なくとも2つの核酸の任意の組み合わせである、請求項65に記載の方法。

【請求項76】 前記免疫刺激核酸が、8と100との間のヌクレオチド長である、請求項65に記載の方法。

【請求項77】 前記免疫刺激核酸が、12と40との間のヌクレオチド長である、請求項65に記載の方法。

【請求項78】 請求項65に記載の方法であって、ここで前記免疫刺激核酸が、以下：

【化4】

ggGGTCAACGTTGAgggggG	ODN 1585	配列番号1
tcgtcgtttgtcgtttgtcgtt	ODN 2022	配列番号2
ggggtcgtcgttttgggggg	ODN 2184	配列番号3
tcgtcgtttgtcgttttgggggg	ODN 2185	配列番号4
ggggtcgacgtcaggggggg	ODN 2192	配列番号5
ggggtcacgtcaggggggg	ODN 2204	配列番号6
ggGGGACGATCGTCgggggG	ODN 2216	配列番号7
gggggtcgtacgacgggggg	ODN 2217	配列番号8
ggGGGACGATATCGTCgggggG	ODN 2245	配列番号9
ggGGGACGACGTCGTCgggggG	ODN 2246	配列番号10
ggGGGACGAGCTCGTCgggggG	ODN 2247	配列番号11
ggGGGACGTACGTCgggggG	ODN 2248	配列番号12
ggGGGACGATCGTTGggggG	ODN 2252	配列番号13
ggGGAACGATCGTCgggggG	ODN 2253	配列番号14
ggGGGACGATCGTCgggggG	ODN 2254	配列番号15
ggGGGACGATCGTCgggggG	ODN 2255	配列番号16
ggGGGTCATCGATGAgggggG	ODN 2260	配列番号17
ggGGTCGTCGACGAgggggG	ODN 2293	配列番号18
ggGGTCGTTTGAACGAgggggG	ODN 2294	配列番号19
ggGGACGTTTGAACGTgggggG	ODN 2295	配列番号20
ggGGAACGACGTCGTTgggggG	ODN 2297	配列番号21
ggGGAACGTACGTCgggggG	ODN 2298	配列番号22
ggGGAACGTACGTACGTTgggggG	ODN 2299	配列番号23
ggGGTCACCGGTGAgggggG	ODN 2300	配列番号24
ggGGTCGACGTACGTGAgggggG	ODN 2301	配列番号25
ggGGACCGGTACCGGTgggggG	ODN 2302	配列番号26
ggGTCGACGTGAgggggG	ODN 2303	配列番号27
ggGGTCGACGTGAgggggG	ODN 2304	配列番号28
ggGGAACGTAAACGTTgggggG	ODN 2305	配列番号29
ggGGACGTGACGTgggggG	ODN 2306	配列番号30
ggGGGTCGTTTCGTTgggggG	ODN 2311	配列番号31
ggGACGATCGTCgggggG	ODN 2328	配列番号32
ggGTCGTCGACGAggggggG	ODN 2329	配列番号33
ggTCGTCGACGAggggggG	ODN 2330	配列番号34
ggGACGATCGTCgggggG	ODN 2332	配列番号35
ggGGTCGACGTGACGTGAGgggggG	ODN 2334	配列番号36、および
ggGGACGACGTGTCGgggggG	ODN 2336	配列番号37、

からなる群より選択される配列を有し、

ここで各小文字が、ホスホロチオエート結合を示し、そして各大文字が、ホスホジエステル結合を示す、

方法。

【請求項79】 前記被験体が、増殖性障害およびウイルス性感染からなる群より選択される状態を有する、請求項65に記載の方法。

【請求項80】 請求項65に記載の方法であって、ここで、前記被験体が、以下：

毛様細胞性白血病、慢性骨髄性白血病、皮膚T細胞白血病、多発性骨髄腫、濾胞性リンパ腫、悪性黒色腫、扁平上皮癌、AIDS関連カポジ肉腫、腎細胞癌、前立腺癌、膀胱細胞癌、子宮頸部形成異常、および結腸癌からなる群より選択される増殖性障害を有する、方法。

【請求項81】 請求項65に記載の方法であって、ここで、前記被験体が、以下：

B型肝炎、C型肝炎、尖圭コンジローム、ヒト免疫不全ウイルス、ヘルペス、サイトメガロウイルス、エプスタインバーウイルス、およびパピローマウイルスからなる群より選択されるウイルス性障害を有する、方法。

【請求項82】 被験体を処置するために有効なIFN- α の用量を減少する方法であって、ここで、該方法が、以下：

IFN- α での処置を必要とする被験体に対し、IFN- α を含む薬学的組成物を投与する工程、および

そのような処置を必要とする該被験体に、該投与されるIFN- α と一緒にときに有効なIFN- α 処置である量で免疫刺激核酸を含む薬学的組成物を共投与する工程、を包含する方法であって、ここで、投与されるIFN- α の量が、該免疫刺激核酸を共投与する工程がない場合に必要とされるIFN- α の量よりも少ない、

方法。

【請求項83】 前記投与されるIFN- α の量が、前記免疫刺激核酸を共投与する工程がない場合に必要とされる前記IFN- α の量よりも少なくとも20%少なくである、請求項82に記載の方法。

【請求項84】 前記投与されるIFN- α の量が、前記免疫刺激核酸を共投与する工程がない場合に必要とされる前記IFN- α の量よりも少なくとも3

0%少なくである、請求項82に記載の方法。

【請求項85】 前記投与されるIFN- α の量が、前記免疫刺激核酸を共投与する工程がない場合に必要とされる前記IFN- α の量よりも少なくとも40%少なくである、請求項82に記載の方法。

【請求項86】 前記投与されるIFN- α の量が、前記免疫刺激核酸を共投与する工程がない場合に必要とされる前記IFN- α の量よりも少なくとも50%少なくである、請求項82に記載の方法。

【請求項87】 前記免疫刺激核酸を含む薬学的組成物が、局所的に投与される、請求項82に記載の方法。

【請求項88】 前記免疫刺激核酸が、改変されたものである、請求項82に記載の方法。

【請求項89】 前記免疫刺激核酸が、以下：
ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、メチルホスホネート、およびペプチド
からなる群より選択される少なくとも1つのヌクレアーゼ耐性ヌクレオチド間結合を有する骨格を含む、請求項82に記載の方法。

【請求項90】 前記免疫刺激核酸が、少なくとも1つのヌクレオチドアナログまたはヌクレオチド誘導体を含む、請求項82に記載の方法。

【請求項91】 前記免疫刺激核酸が、パリンドロームでない、請求項82に記載の方法。

【請求項92】 前記免疫刺激核酸が、CpG核酸である、請求項82に記載の方法。

【請求項93】 前記免疫刺激核酸が、非CpG核酸である、請求項82に記載の方法。

【請求項94】 前記非CpG免疫刺激核酸が、トリッチ核酸である、請求項93に記載の方法。

【請求項95】 前記非CpG免疫刺激核酸が、ポリG核酸である、請求項93に記載の方法。

【請求項96】 前記免疫刺激核酸が、以下：

C p G核酸、Tリッチ核酸、およびポリG核酸

からなる群より選択される少なくとも2つの核酸の任意の組み合わせである、請求項82に記載の方法。

【請求項97】 前記免疫刺激核酸が、8と100との間のヌクレオチド長である、請求項82に記載の方法。

【請求項98】 前記免疫刺激核酸が、12と40との間のヌクレオチド長である、請求項82に記載の方法。

【請求項99】 請求項82に記載の方法であって、ここで前記免疫刺激核酸が、以下：

【化5】

ggGGTCAACGTTGAgggggG	ODN 1585	配列番号1
tcgtcgtttgtcgtttgtcgtt	ODN 2022	配列番号2
ggggcgtcgttttgggggg	ODN 2184	配列番号3
tcgtcgtttgtcgttttgggggg	ODN 2185	配列番号4
ggggcgcacgtcaggggggg	ODN 2192	配列番号5
ggggcgcacgaaggggggg	ODN 2204	配列番号6
ggGGGACGATCGTCggggggG	ODN 2216	配列番号7
gggggtcgtacgacgggggg	ODN 2217	配列番号8
ggGGGACGATATCGTCggggggG	ODN 2245	配列番号9
ggGGGACGACGTCGTCggggggG	ODN 2246	配列番号10
ggGGGACGAGCTCGTCggggggG	ODN 2247	配列番号11
ggGGGACGTACGTCggggggG	ODN 2248	配列番号12
ggGGGACGATCGTTGgggggG	ODN 2252	配列番号13
ggGGAACGATCGTCggggggG	ODN 2253	配列番号14
ggGGGGACGATCGTCggggggG	ODN 2254	配列番号15
ggGGGACGATCGTCGggggggG	ODN 2255	配列番号16
ggGGGTCATCGATGAgggggG	ODN 2260	配列番号17
ggGGTCGTCGACGAgggggG	ODN 2293	配列番号18
ggGGTCGTTTCAACGAgggggG	ODN 2294	配列番号19
ggGGACGTTTCAACGTggggggG	ODN 2295	配列番号20
ggGGAACGACGTCGTTggggggG	ODN 2297	配列番号21
ggGGAACGTACGTCggggggG	ODN 2298	配列番号22
ggGGAACGTACGTACGTTggggggG	ODN 2299	配列番号23
ggGGTCACCGGTGAgggggG	ODN 2300	配列番号24
ggGGTCGACGTACGTCGAgggggG	ODN 2301	配列番号25
ggGGACCGGTACCGGTggggggG	ODN 2302	配列番号26
ggGTCGACGTTCGAgggggG	ODN 2303	配列番号27
ggGGTCGACGTTCGAgggggG	ODN 2304	配列番号28
ggGGAACGTTAACGTTggggggG	ODN 2305	配列番号29
ggGGACGTTCGACGTggggggG	ODN 2306	配列番号30
ggGGGTCGTTTCGTTggggggG	ODN 2311	配列番号31
ggGACGATCGTCGggggggG	ODN 2328	配列番号32
ggGTCGTCGACGAgggggggG	ODN 2329	配列番号33
ggTCGTCGACGAGggggggG	ODN 2330	配列番号34
ggGGACGATCGTCGggggggG	ODN 2332	配列番号35
ggGGTCGACGTTCGACGTTCGAGggggggG	ODN 2334	配列番号36、および
ggGGACGACGTTCGTCggggggG	ODN 2336	配列番号37、

からなる群より選択される配列を有し、
ここで各小文字が、ホスホロチオエート結合を示し、そして各大文字が、ホスホジエステル結合を示す、
方法。

【請求項100】 前記被験体が、増殖性障害およびウイルス性感染からなる群より選択される状態を有する、請求項82に記載の方法。

【請求項101】 請求項82に記載の方法であって、ここで、前記被験体が、以下：

毛様細胞性白血病、慢性骨髄性白血病、皮膚T細胞白血病、多発性骨髄腫、濾胞性リンパ腫、悪性黒色腫、扁平上皮癌、AIDS関連カポジ肉腫、腎細胞癌、前立腺癌、膀胱細胞癌、子宮頸部形成異常、および結腸癌
からなる群より選択される増殖性障害を有する、方法。

【請求項102】 請求項82に記載の方法であって、ここで、前記被験体が、以下：

B型肝炎、C型肝炎、尖圭コンジローム、ヒト免疫不全ウイルス、ヘルペス、サイトメガロウイルス、エプスタインバーウイルス、およびパピローマウイルス
からなる群より選択されるウイルス性障害を有する、方法。

【請求項103】 IFN- α での処置を受けつつあるまたは必要とする被験体においてIFN- α 処置に関連する副作用を防ぐ方法であって、該方法は、
以下：

IFN- α での処置を必要とする被験体に対し、IFN- α を含む薬学的組成物を投与する工程、および

そのような処置を必要とする該被験体に、該投与されるIFN- α と一緒にときに有効なIFN- α 処置である量で免疫刺激核酸を含む薬学的組成物を共投与する工程、を包含する方法であって、ここで、IFN- α 処置に関連する副作用が、IFN- α が該免疫刺激核酸を共投与する工程なしに投与される場合の副作用と比較して減少される、
方法。

【請求項104】 前記免疫刺激核酸を含む薬学的組成物が、局所的に投与

される、請求項103に記載の方法。

【請求項105】 前記IFN- α 処置に関連する副作用が、全身性である、請求項103に記載の方法。

【請求項106】 前記IFN- α 処置に関連する副作用が、インフルエンザ様症候群、熱、頭痛、悪寒、筋痛、疲労、食欲不振、悪心、嘔吐、下痢、およびうつ病からなる群より選択される、請求項103に記載の方法。

【請求項107】 前記免疫刺激核酸が、改変されたものである、請求項103に記載の方法。

【請求項108】 前記免疫刺激核酸が、以下：
ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、メチルホスホネート、およびペプチド
からなる群より選択される少なくとも1つのヌクレアーゼ耐性ヌクレオチド間結合を有する骨格を含む、請求項103に記載の方法。

【請求項109】 前記免疫刺激核酸が、少なくとも1つのヌクレオチドアナログまたはヌクレオチド誘導体を含む、請求項103に記載の方法。

【請求項110】 前記免疫刺激核酸が、パリンδροームでない、請求項103に記載の方法。

【請求項111】 前記免疫刺激核酸が、CpG核酸である、請求項103に記載の方法。

【請求項112】 前記免疫刺激核酸が、非CpG核酸である、請求項103に記載の方法。

【請求項113】 前記非CpG免疫刺激核酸が、トリッチ核酸である、請求項112に記載の方法。

【請求項114】 前記非CpG免疫刺激核酸が、ポリG核酸である、請求項112に記載の方法。

【請求項115】 前記免疫刺激核酸が、以下：
CpG核酸、トリッチ核酸、およびポリG核酸
からなる群より選択される少なくとも2つの核酸の任意の組み合わせである、請求項103に記載の方法。

【請求項116】 前記免疫刺激核酸が、8と100との間のヌクレオチド長である、請求項103に記載の方法。

【請求項117】 前記免疫刺激核酸が、12と40との間のヌクレオチド長である、請求項103に記載の方法。

【請求項118】 請求項103に記載の方法であって、ここで前記免疫刺激核酸が、以下：

【化6】

ggGGTCAACGTTGAggggG	ODN 1585	配列番号1
tcgtcgtttgtcgtttgtcgtt	ODN 2022	配列番号2
ggggcgtcgtttggggg	ODN 2184	配列番号3
tcgtcgtttgtcgtttggggg	ODN 2185	配列番号4
ggggcgcgcgcgcgcggggg	ODN 2192	配列番号5
ggggcgcgcgcgcgcggggg	ODN 2204	配列番号6
ggGGGACGATCGTCgggggG	ODN 2216	配列番号7
ggggcgcgcgcgcgcggggg	ODN 2217	配列番号8
ggGGGACGATATCGTCgggggG	ODN 2245	配列番号9
ggGGGACGACGTCGTCgggggG	ODN 2246	配列番号10
ggGGGACGAGCTCGTCgggggG	ODN 2247	配列番号11
ggGGGACGTCGTCgggggG	ODN 2248	配列番号12
ggGGGACGATCGTTGggggG	ODN 2252	配列番号13
ggGGAACGATCGTCgggggG	ODN 2253	配列番号14
ggGGGACGATCGTCgggggG	ODN 2254	配列番号15
ggGGGACGATCGTCgggggG	ODN 2255	配列番号16
ggGGGTCATCGATGAgggggG	ODN 2260	配列番号17
ggGGTCGTCGACGAgggggG	ODN 2293	配列番号18
ggGGTCGTTTCAACGAgggggG	ODN 2294	配列番号19
ggGGACGTTTCAACGTgggggG	ODN 2295	配列番号20
ggGGAACGACGTCGTTgggggG	ODN 2297	配列番号21
ggGGAACGTACGTCgggggG	ODN 2298	配列番号22
ggGGAACGTACGTACGTTgggggG	ODN 2299	配列番号23
ggGGTCACCGGTGAgggggG	ODN 2300	配列番号24
ggGGTCOACGTACGTCGAgggggG	ODN 2301	配列番号25
ggGGACCGGTACCGGTgggggG	ODN 2302	配列番号26
ggGTTCGACGTCGAgggggG	ODN 2303	配列番号27
ggGGTCGACGTCGagggg	ODN 2304	配列番号28
ggGGAACGTAAACGTTgggggG	ODN 2305	配列番号29
ggGGACGTCGACGTgggggG	ODN 2306	配列番号30
ggGGGTCGTTTCGTTgggggG	ODN 2311	配列番号31
ggGACGATCGTCGgggggG	ODN 2328	配列番号32
ggGTCGTCGACGAgggggG	ODN 2329	配列番号33
ggTCGTCGACGAGgggggG	ODN 2330	配列番号34
ggGGACGATCGTCGgggggG	ODN 2332	配列番号35
ggGGTCGACGTCGACGTCGAGgggggG	ODN 2334	配列番号36、および
ggGGACGACGTCGTCgggggG	ODN 2336	配列番号37、

からなる群より選択される配列を有し、

ここで各小文字が、ホスホロチオエート結合を示し、そして各大文字が、ホスホジエステル結合を示す、

方法。

【請求項119】 前記被験体が、増殖性障害およびウイルス性感染からなる群より選択される状態を有する、請求項103に記載の方法。

【請求項120】 請求項103に記載の方法であって、ここで、前記被験体が、以下：

毛様細胞性白血病、慢性骨髄性白血病、皮膚T細胞白血病、多発性骨髄腫、濾胞性リンパ腫、悪性黒色腫、扁平上皮癌、AIDS関連カポジ肉腫、腎細胞癌、前立腺癌、膀胱細胞癌、子宮頸部形成異常、および結腸癌からなる群より選択される増殖性障害を有する、方法。

【請求項121】 請求項103に記載の方法であって、ここで、前記被験体が、以下：

B型肝炎、C型肝炎、尖圭コンジローム、ヒト免疫不全ウイルス、ヘルペス、サイトメガロウイルス、エプスタインバーウイルス、およびパピローマウイルスからなる群より選択されるウイルス性障害を有する、方法。

【請求項122】 IFN- α 処置を必要とする被験体において、該IFN- α 処置の効力を高める方法であって、ここで該方法が、以下：

そのような処置を必要とする被験体に、該被験体の状態を処置するために有効な量のIFN- α を含む薬学的組成物を投与する工程；

ドナーから天然インターフェロン産生細胞（IPC）を単離する工程；

該単離されたIPCを、該IPCを導入してIFN- α を放出するために有効な量の免疫刺激核酸を含む薬学的組成物とエキソビボで接触させる工程；および

該被験体に該接触させた細胞を投与する工程、
を包含する、方法。

【請求項123】 前記ドナーが、前記被験体である、請求項122に記載の方法。

【請求項124】 前記単離されたIPCを抗原と接触させる工程をさらに包含する、請求項122に記載の方法。

【請求項125】 前記接触させた細胞を投与する工程が、局所注入を包含する、請求項122に記載の方法。

【請求項126】 前記局所注入が、標的組織を提供する血管を介する、請求項125に記載の方法。

【請求項127】 前記血管が、肝動脈、門脈、腹腔動脈、および脾動脈からなる群より選択される、請求項126に記載の方法。

【請求項128】 前記免疫刺激核酸が、改変されたものである、請求項122に記載の方法。

【請求項129】 前記免疫刺激核酸が、以下：
ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、メチルホスホネート、およびペプチド
からなる群より選択される少なくとも1つのヌクレアーゼ耐性ヌクレオチド間結合を有する骨格を含む、請求項122に記載の方法。

【請求項130】 前記免疫刺激核酸が、少なくとも1つのヌクレオチドアナログまたはヌクレオチド誘導体を含む、請求項122に記載の方法。

【請求項131】 前記免疫刺激核酸が、パリンδροームでない、請求項122に記載の方法。

【請求項132】 前記免疫刺激核酸が、CpG核酸である、請求項122に記載の方法。

【請求項133】 前記免疫刺激核酸が、非CpG核酸である、請求項122に記載の方法。

【請求項134】 前記非CpG免疫刺激核酸が、トリッチ核酸である、請求項133に記載の方法。

【請求項135】 前記非CpG免疫刺激核酸が、ポリG核酸である、請求項133に記載の方法。

【請求項136】 前記免疫刺激核酸が、以下：
CpG核酸、トリッチ核酸、およびポリG核酸
からなる群より選択される少なくとも2つの核酸の任意の組み合わせである、請求項122に記載の方法。

【請求項137】 前記免疫刺激核酸が、8と100との間のヌクレオチド長である、請求項122に記載の方法。

【請求項138】 前記免疫刺激核酸が、12と40との間のヌクレオチド長である、請求項122に記載の方法。

【請求項139】 請求項122に記載の方法であって、ここで前記免疫刺激核酸が、以下：

【化7】

ggGGTCAACGTTGAgggggG	ODN 1585	配列番号1
tcgtcgtttgtcgtttgtcgtt	ODN 2022	配列番号2
ggggcgtcgtttgggggg	ODN 2184	配列番号3
tcgtcgtttgtcgtttgggggg	ODN 2185	配列番号4
ggggcgcacgtcgagggggg	ODN 2192	配列番号5
ggggcgcacgtcgagggggg	ODN 2204	配列番号6
ggGGGACGATCGTCgggggG	ODN 2216	配列番号7
gggggtcgtacgacgggggg	ODN 2217	配列番号8
ggGGGACGATATCGTCgggggG	ODN 2245	配列番号9
ggGGGACGACGTCGTCgggggG	ODN 2246	配列番号10
ggGGGACGAGCTCGTCgggggG	ODN 2247	配列番号11
ggGGGACGTACGTCgggggG	ODN 2248	配列番号12
ggGGGACGATCGTTGggggG	ODN 2252	配列番号13
ggGGAACGATCGTCgggggG	ODN 2253	配列番号14
ggGGGACGATCGTCgggggG	ODN 2254	配列番号15
ggGGGACGATCGTCgggggG	ODN 2255	配列番号16
ggGGGTCATCGATGAgggggG	ODN 2260	配列番号17
ggGGTCGTCGACGAgggggG	ODN 2293	配列番号18
ggGGTCGTTCAACGAgggggG	ODN 2294	配列番号19
ggGGACGTTCAACGTgggggG	ODN 2295	配列番号20
ggGGAACGACGTCGTTgggggG	ODN 2297	配列番号21
ggGGAACGTACGTCgggggG	ODN 2298	配列番号22
ggGGAACGTACGTACGTTgggggG	ODN 2299	配列番号23
ggGGTCACCGGTGAgggggG	ODN 2300	配列番号24
ggGGTCGACGTACGTCGAgggggG	ODN 2301	配列番号25
ggGGACCGGTACCGGTgggggG	ODN 2302	配列番号26
ggGTCGACGTGAGgggggG	ODN 2303	配列番号27
ggGGTCGACGTGAGgggggG	ODN 2304	配列番号28
ggGGAACGTTAACGTTgggggG	ODN 2305	配列番号29
ggGGACGTGACGTgggggG	ODN 2306	配列番号30
ggGGGTCGTTGTTgggggG	ODN 2311	配列番号31
ggGACGATCGTCGgggggG	ODN 2328	配列番号32
ggGTCGTCGACGAgggggG	ODN 2329	配列番号33
ggTCGTCGACGAGgggggG	ODN 2330	配列番号34
ggGGACGATCGTCGgggggG	ODN 2332	配列番号35
ggGGTCGACGTGACGTCGAGgggggG	ODN 2334	配列番号36、および
ggGGACGACGTCGTCgggggG	ODN 2336	配列番号37、

からなる群より選択される配列を有し、

ここで各小文字が、ホスホロチオエート結合を示し、そして各大文字が、ホスホジエステル結合を示す、

方法。

【請求項140】 前記被験体が、増殖性障害およびウイルス性感染からな

る群より選択される状態を有する、請求項122に記載の方法。

【請求項141】 請求項122に記載の方法であって、ここで、前記被験体が、以下：

毛様細胞性白血病、慢性骨髄性白血病、皮膚T細胞白血病、多発性骨髄腫、濾胞性リンパ腫、悪性黒色腫、扁平上皮癌、AIDS関連カポジ肉腫、腎細胞癌、前立腺癌、膀胱細胞癌、子宮頸部形成異常、および結腸癌からなる群より選択される増殖性障害を有する、方法。

【請求項142】 請求項122に記載の方法であって、ここで、前記被験体が、以下：

B型肝炎、C型肝炎、尖圭コンジローム、ヒト免疫不全ウイルス、ヘルペス、サイトメガロウイルス、エプスタイン-バーウイルス、およびパピローマウイルス

からなる群より選択されるウイルス性障害を有する、方法。

【請求項143】 インビトロで天然インターフェロン産生細胞（IPC）の生存を支える方法であって、該方法は、以下：

被験体からIPCを単離する工程；

組織培養に適した滅菌培地において該IPCを培養する工程；および

該IPCを、インターロイキン3（IL-3）の非存在下で該IPCの増殖を支えるために有効な量の免疫刺激核酸とインビトロで接触させる工程、を包含する、方法。

【請求項144】 前記IPCが、前駆体2型樹状細胞（pDC2）である、請求項143に記載の方法。

【請求項145】 前記IPCが、IL-3の非存在下で培養される、請求項143に記載の方法。

【請求項146】 前記IPCが、GM-CSFの非存在下で培養される、請求項143に記載の方法。

【請求項147】 前記免疫刺激核酸が、改変されたものである、請求項143に記載の方法。

【請求項148】 前記免疫刺激核酸が、以下：

ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、メチルホスホネート、およびペプチド

からなる群より選択される少なくとも1つのヌクレアーゼ耐性ヌクレオチド間結合を有する骨格を含む、請求項143に記載の方法。

【請求項149】 前記免疫刺激核酸が、少なくとも1つのヌクレオチドアナログまたはヌクレオチド誘導体を含む、請求項143に記載の方法。

【請求項150】 前記免疫刺激核酸が、パリンドロームでない、請求項143に記載の方法。

【請求項151】 前記免疫刺激核酸が、CpG核酸である、請求項143に記載の方法。

【請求項152】 前記免疫刺激核酸が、非CpG核酸である、請求項143に記載の方法。

【請求項153】 前記非CpG免疫刺激核酸が、トリッチ核酸である、請求項152に記載の方法。

【請求項154】 前記非CpG免疫刺激核酸が、ポリG核酸である、請求項152に記載の方法。

【請求項155】 前記免疫刺激核酸が、以下：
CpG核酸、トリッチ核酸、およびポリG核酸
からなる群より選択される少なくとも2つの核酸の任意の組み合わせである、請求項143に記載の方法。

【請求項156】 前記免疫刺激核酸が、8と100との間のヌクレオチド長である、請求項143に記載の方法。

【請求項157】 前記免疫刺激核酸が、12と40との間のヌクレオチド長である、請求項143に記載の方法。

【請求項158】 請求項143に記載の方法であって、ここで前記免疫刺激核酸が、以下：

【化8】

ggGGTCAACGTTGAgggggG	ODN 1585	配列番号1
tcgtcgtttgtcgtttgtcgtt	ODN 2022	配列番号2
ggggcgtcgttttggggg	ODN 2184	配列番号3
tcgtcgtttgtcgttttggggg	ODN 2185	配列番号4
ggggcgcacgtcgaaggggg	ODN 2192	配列番号5
ggggcgcacgaaggggg	ODN 2204	配列番号6
ggGGGACGATCGTCgggggG	ODN 2216	配列番号7
ggggcgtacgacggggg	ODN 2217	配列番号8
ggGGGACGATATCGTCgggggG	ODN 2245	配列番号9
ggGGGACGACGTCGTCgggggG	ODN 2246	配列番号10
ggGGGACGACGTCGTCgggggG	ODN 2247	配列番号11
ggGGGACGTACGTCgggggG	ODN 2248	配列番号12
ggGGGACGATCGTTGggggG	ODN 2252	配列番号13
ggGGAACGATCGTCgggggG	ODN 2253	配列番号14
ggGGGACGATCGTCgggggG	ODN 2254	配列番号15
ggGGGACGATCGTCgggggG	ODN 2255	配列番号16
ggGGGTCATCGATGAaggggG	ODN 2260	配列番号17
ggGGTCGTCGACGAaggggG	ODN 2293	配列番号18
ggGGTCGTTTCAACGAaggggG	ODN 2294	配列番号19
ggGGACGTTTCAACGTgggggG	ODN 2295	配列番号20
ggGGAACGACGTCGTTgggggG	ODN 2297	配列番号21
ggGGAACGTACGTCgggggG	ODN 2298	配列番号22
ggGGAACGTACGTACGTTgggggG	ODN 2299	配列番号23
ggGGTCACCGGTGAaggggG	ODN 2300	配列番号24
ggGGTCGACGTACGTCGAaggggG	ODN 2301	配列番号25
ggGOACCGGTACCGGTgggggG	ODN 2302	配列番号26
ggGTCGACGTTCGAaggggG	ODN 2303	配列番号27
ggGGTCGACGTCCagggg	ODN 2304	配列番号28
ggGGAACGTTAACGTTgggggG	ODN 2305	配列番号29
ggGGACGTCGACGTggggG	ODN 2306	配列番号30
ggGGGTCGTTTCGTTgggggG	ODN 2311	配列番号31
ggGACGATCGTCGgggggG	ODN 2328	配列番号32
ggGTCGTCGACGAagggggG	ODN 2329	配列番号33
ggTCGTCGACGAagggggG	ODN 2330	配列番号34
ggGGACGATCGTCgggggG	ODN 2332	配列番号35
ggGGTCGACGTTCGACGTTCGAGgggggG	ODN 2334	配列番号36、および
ggGGACGACGTTCGTCgggggG	ODN 2336	配列番号37、

からなる群より選択される配列を有し、

ここで各小文字が、ホスホロチオエート結合を示し、そして各大文字が、ホスホジエステル結合を示す、

方法。

【請求項159】 単離されたインターフェロン産生細胞（IPC）をインビトロで刺激する方法であって、該方法は、以下

被験体からIPCを単離する工程；

組織培養に適した滅菌培地において該IPCを培養する工程；および

該IPCを、少なくとも1つのI型インターフェロンの分泌を誘導するために有効な量の免疫刺激核酸とインビトロで接触させる工程、

を包含する、方法。

【請求項160】 前記IPCが、前駆体2型樹状細胞(pDC2)である、請求項159に記載の方法。

【請求項161】 前記I型インターフェロンが、IFN- α である、請求項159に記載の方法。

【請求項162】 前記IPCが、IL-3の非存在下で培養される、請求項159に記載の方法。

【請求項163】 前記IPCが、GM-CSFの非存在下で培養される、請求項159に記載の方法。

【請求項164】 前記免疫刺激核酸が、改変されたものである、請求項159に記載の方法。

【請求項165】 前記免疫刺激核酸が、以下：
ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、メチルホスホネート、およびペプチド
からなる群より選択される少なくとも1つのヌクレアーゼ耐性ヌクレオチド間結合を有する骨格を含む、請求項159に記載の方法。

【請求項166】 前記免疫刺激核酸が、少なくとも1つのヌクレオチドアナログまたはヌクレオチド誘導体を含む、請求項159に記載の方法。

【請求項167】 前記免疫刺激核酸が、パリンδροームでない、請求項159に記載の方法。

【請求項168】 前記免疫刺激核酸が、CpG核酸である、請求項159に記載の方法。

【請求項169】 前記免疫刺激核酸が、非CpG核酸である、請求項159に記載の方法。

【請求項170】 前記非CpG免疫刺激核酸が、トリッチ核酸である、請求項169に記載の方法。

【請求項171】 前記非CpG免疫刺激核酸が、ポリG核酸である、請求項169に記載の方法。

【請求項172】 前記免疫刺激核酸が、以下：

CpG核酸、トリッチ核酸、およびポリG核酸

からなる群より選択される少なくとも2つの核酸の任意の組み合わせである、請求項159に記載の方法。

【請求項173】 前記免疫刺激核酸が、8と100との間のヌクレオチド長である、請求項159に記載の方法。

【請求項174】 前記免疫刺激核酸が、12と40との間のヌクレオチド長である、請求項159に記載の方法。

【請求項175】 請求項159に記載の方法であって、ここで前記免疫刺激核酸が、以下：

【化9】

ggGGTCAACGTTGAgggggG	ODN 1585	配列番号1
tcgtcgttttgtcgtttgtcgtt	ODN 2022	配列番号2
ggggcgtcgttttggggg	ODN 2184	配列番号3
tcgtcgttttgtcgttttggggg	ODN 2185	配列番号4
ggggcgcacgtcgagggggg	ODN 2192	配列番号5
ggggcgcacgtcgagggggg	ODN 2204	配列番号6
ggGGGACGATCGTCgggggG	ODN 2216	配列番号7
ggggcgtcgtacgagggggg	ODN 2217	配列番号8
ggGGGACGATATCGTCgggggG	ODN 2245	配列番号9
ggGGGACGACGTCGTCgggggG	ODN 2246	配列番号10
ggGGGACGAGCTCGTCgggggG	ODN 2247	配列番号11
ggGGGACGTACGTCgggggG	ODN 2248	配列番号12
ggGGGACGATCGTTGggggG	ODN 2252	配列番号13
ggGGAACGATCGTCgggggG	ODN 2253	配列番号14
ggGGGACGATCGTCgggggG	ODN 2254	配列番号15
ggGGGACGATCGTCgggggG	ODN 2255	配列番号16
ggGGGTCATCGATGAgggggG	ODN 2260	配列番号17
ggGGTCGTCGACGAgggggG	ODN 2293	配列番号18
ggGGTCGTTCAACGAgggggG	ODN 2294	配列番号19
ggGGACGTTCAACGTgggggG	ODN 2295	配列番号20
ggGGAACGACGTCGTTgggggG	ODN 2297	配列番号21
ggGGAACGTACGTCgggggG	ODN 2298	配列番号22
ggGGAACGTACGTACGTTgggggG	ODN 2299	配列番号23
ggGGTCACCGGTGAgggggG	ODN 2300	配列番号24
ggGGTCGACGTACGTCGAgggggG	ODN 2301	配列番号25
ggGOACCGGTACCGGTgggggG	ODN 2302	配列番号26
ggGTCGACGTCGAgggggG	ODN 2303	配列番号27
ggGGTCGACGTCGagggg	ODN 2304	配列番号28
ggGGAACGTTAACGTTgggggG	ODN 2305	配列番号29
ggGGACGTCGACGTgggggG	ODN 2306	配列番号30
ggGGGTCGTTGTTgggggG	ODN 2311	配列番号31
ggGACGATCGTTCgggggG	ODN 2328	配列番号32
ggGTCGTCGACGAgggggG	ODN 2329	配列番号33
ggTCGTCGACGAGgggggG	ODN 2330	配列番号34
ggGGACGATCGTCgggggG	ODN 2332	配列番号35
ggGGTCGACGTCGACGTCGAGgggggG	ODN 2334	配列番号36、および
ggGGACGACGTCGTCgggggG	ODN 2336	配列番号37、

からなる群より選択される配列を有し、
ここで各小文字が、ホスホロチオエート結合を示し、そして各大文字が、ホスホジエステル結合を示す、
方法。

【請求項176】 IPCを、少なくとも2つのI型インターフェロンの分泌を誘導するために有効な量の免疫刺激核酸と接触させる工程を包含する、複数のI型IFNサブタイプの産生を刺激する方法。

【請求項177】 前記接触させる工程が、インビボで起こる、請求項176に記載の方法。

【請求項178】 前記接触させる工程が、インビトロで起こる、請求項176に記載の方法。

【請求項179】 前記IPCが、前駆体2型樹状細胞(pDC2)である、請求項176に記載の方法。

【請求項180】 前記IPCが、単離されたものである、請求項176に記載の方法。

【請求項181】 前記IPCが、少なくとも3つのI型インターフェロンを分泌するために誘導される、請求項176に記載の方法。

【請求項182】 前記IPCが、少なくとも4つのI型インターフェロンを分泌するために誘導される、請求項176に記載の方法。

【請求項183】 前記IPCが、少なくとも5つのI型インターフェロンを分泌するために誘導される、請求項176に記載の方法。

【請求項184】 前記IPCが、少なくとも6つのI型インターフェロンを分泌するために誘導される、請求項176に記載の方法。

【請求項185】 前記IPCが、少なくとも7つのI型インターフェロンを分泌するために誘導される、請求項176に記載の方法。

【請求項186】 前記IPCが、少なくとも8つのI型インターフェロンを分泌するために誘導される、請求項176に記載の方法。

【請求項187】 前記免疫刺激核酸が、改変されたものである、請求項176に記載の方法。

【請求項188】 前記免疫刺激核酸が、以下：
ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、メチルホスホネート、およびペプチド
からなる群より選択される少なくとも1つのヌクレアーゼ耐性ヌクレオチド間結合を有する骨格を含む、請求項176に記載の方法。

【請求項189】 前記免疫刺激核酸が、少なくとも1つのヌクレオチドアナログまたはヌクレオチド誘導体を含む、請求項176に記載の方法。

【請求項190】 前記免疫刺激核酸が、パリンドロームでない、請求項176に記載の方法。

【請求項191】 前記免疫刺激核酸が、CpG核酸である、請求項176に記載の方法。

【請求項192】 前記免疫刺激核酸が、非CpG核酸である、請求項176に記載の方法。

【請求項193】 前記非CpG免疫刺激核酸が、トリッチ核酸である、請求項192に記載の方法。

【請求項194】 前記非CpG免疫刺激核酸が、ポリG核酸である、請求項192に記載の方法。

【請求項195】 前記免疫刺激核酸が、以下：
CpG核酸、トリッチ核酸、およびポリG核酸
からなる群より選択される少なくとも2つの核酸の任意の組み合わせである、請求項176に記載の方法。

【請求項196】 前記免疫刺激核酸が、8と100との間のヌクレオチド長である、請求項176に記載の方法。

【請求項197】 前記免疫刺激核酸が、12と40との間のヌクレオチド長である、請求項176に記載の方法。

【請求項198】 請求項176に記載の方法であって、ここで前記免疫刺激核酸が、以下：

【化10】

ggGGTCAACGTTGAgggggG	ODN 1585	配列番号1
tcgtcgtttgtcgtttgtcgtt	ODN 2022	配列番号2
ggggcgtcgtttgggggg	ODN 2184	配列番号3
tcgtcgtttgtcgtttgggggg	ODN 2185	配列番号4
ggggcgcgcgtcggggggg	ODN 2192	配列番号5
ggggcgcgcgtcggggggg	ODN 2204	配列番号6
ggGGGACGATCGTCgggggG	ODN 2216	配列番号7
ggggcgtcgtcgcgggggg	ODN 2217	配列番号8
ggGGGACGATATCGTCgggggG	ODN 2245	配列番号9
ggGGGACGACGTCGTCgggggG	ODN 2246	配列番号10
ggGGGACGAGCTCGTCgggggG	ODN 2247	配列番号11
ggGGGACGATCGTCgggggG	ODN 2248	配列番号12
ggGGGACGATCGTTGggggG	ODN 2252	配列番号13
ggGGAACGATCGTCgggggG	ODN 2253	配列番号14
ggGGGGACGATCGTCgggggG	ODN 2254	配列番号15
ggGGGACGATCGTCgggggG	ODN 2255	配列番号16
ggGGGTCATCGATGAgggggG	ODN 2260	配列番号17
ggGGTCGTCGACGAgggggG	ODN 2293	配列番号18
ggGGTCGTTTCAACGAgggggG	ODN 2294	配列番号19
ggGGACGTTTCAACGTgggggG	ODN 2295	配列番号20
ggGGAACGACGTCGTTgggggG	ODN 2297	配列番号21
ggGGAACGTACGTCgggggG	ODN 2298	配列番号22
ggGGAACGTACGTACGTTgggggG	ODN 2299	配列番号23
ggGGTCACCGGTGAgggggG	ODN 2300	配列番号24
ggGGTCGACGTACGTCGAgggggG	ODN 2301	配列番号25
ggGGACCGGTACCGGTgggggG	ODN 2302	配列番号26
ggGTCGACGTCGAgggggG	ODN 2303	配列番号27
ggGGTCGACGTCGAgggggG	ODN 2304	配列番号28
ggGGAACGTTAACGTTgggggG	ODN 2305	配列番号29
ggGGACGTCGACGTgggggG	ODN 2306	配列番号30
ggGGGTCGTTTCGTTgggggG	ODN 2311	配列番号31
ggGACGATCGTCGgggggG	ODN 2328	配列番号32
ggGTCGTCGACGAgggggG	ODN 2329	配列番号33
ggTCGTCGACGAGgggggG	ODN 2330	配列番号34
ggGGACGATCGTCgggggG	ODN 2332	配列番号35
ggGGTCGACGTCGACGTCGAGgggggG	ODN 2334	配列番号36、および
ggGGACGACGTCGTCgggggG	ODN 2336	配列番号37、

からなる群より選択される配列を有し、

ここで各小文字が、ホスホロチオエート結合を示し、そして各大文字が、ホスホジエステル結合を示す、

方法。

【請求項199】 IL-12産生を阻害する方法であって、該方法が、IL-12産生細胞を、該IL-12細胞がIL-12を正常に産生する条件下で、インターフェロン産生細胞の存在下で、I型インターフェロンの分泌を誘導するために有効な量で免疫刺激核酸と接触させる工程を包含する、方法。

【請求項200】 請求項199に記載の方法であって、ここで前記免疫刺激核酸が、以下：

【化11】

ggGGTCAACGTTGAgggggG	ODN 1585	配列番号1
tcgtcgtttgtcgtttgtcgtt	ODN 2022	配列番号2
ggggcgtcgttttgggggg	ODN 2184	配列番号3
tcgtcgtttgtcgtttggggg	ODN 2185	配列番号4
ggggcgtcgtcgtcgggggg	ODN 2192	配列番号5
ggggcgtcgtcgtcgggggg	ODN 2204	配列番号6
ggGGGACGATCGTCgggggG	ODN 2216	配列番号7
ggggcgtcgtcgtcgggggg	ODN 2217	配列番号8
ggGGGACGATATCGTCgggggG	ODN 2245	配列番号9
ggGGGACGACGTCGTCgggggG	ODN 2246	配列番号10
ggGGGACGAGTCGTCgggggG	ODN 2247	配列番号11
ggGGGACGTACGTCgggggG	ODN 2248	配列番号12
ggGGGACGATCGTTGgggggG	ODN 2252	配列番号13
ggGGAACGATCGTCgggggG	ODN 2253	配列番号14
ggGGGACGATCGTCgggggG	ODN 2254	配列番号15
ggGGGACGATCGTCgggggG	ODN 2255	配列番号16
ggGGGTCATCGATGAgggggG	ODN 2260	配列番号17
ggGGTCGTCGACGAgggggG	ODN 2293	配列番号18
ggGGTCGTTTCGAACGAgggggG	ODN 2294	配列番号19
ggGGACGTTTCGAACGTgggggG	ODN 2295	配列番号20
ggGGAACGACGTCGTTgggggG	ODN 2297	配列番号21
ggGGAACGTACGTCgggggG	ODN 2298	配列番号22
ggGGAACGTACGTACGTTgggggG	ODN 2299	配列番号23
ggGGTCACCGGTGAgggggG	ODN 2300	配列番号24
ggGGTCGACGTACGTCGAgggggG	ODN 2301	配列番号25
ggGGAACCGTACCGGTgggggG	ODN 2302	配列番号26
ggGTCGACGTTCGAgggggG	ODN 2303	配列番号27
ggGGTCGACGTTCGggggg	ODN 2304	配列番号28
ggGGAACGTTAACGTTgggggG	ODN 2305	配列番号29
ggGGACGTTCGACGTgggggG	ODN 2306	配列番号30
ggGGGTCGTTTCGTTgggggG	ODN 2311	配列番号31
ggGACGATCGTCGgggggG	ODN 2328	配列番号32
ggGTCGTCGACGAggggggG	ODN 2329	配列番号33
ggTCGTCGACGAGgggggG	ODN 2330	配列番号34
ggGGACGATCGTCGgggggG	ODN 2332	配列番号35
ggGGTCGACGTTCGACGTCGAGgggggG	ODN 2334	配列番号36、および
ggGGACGACGTTCGTCgggggG	ODN 2336	配列番号37、

からなる群より選択される配列を有し、

ここで各小文字が、ホスホロチオエート結合を示し、そして各大文字が、ホスホジエステル結合を示す、

方法。

【請求項201】 以下：

【化12】

ggGGTCAACGTTGAgggggG	ODN 1585	配列番号1
tcgtcgttttgcgttttgcgtt	ODN 2022	配列番号2
ggggcgtcgttttggggg	ODN 2184	配列番号3
tcgtcgttttgcgttttggggg	ODN 2185	配列番号4
ggggcgcacgtcgagggggg	ODN 2192	配列番号5
gggtcatcgatgagggggg	ODN 2204	配列番号6
ggGGGACGATCGTCgggggG	ODN 2216	配列番号7
gggggicgtacgacggggg	ODN 2217	配列番号8
ggGGGACGATATCGTCgggggG	ODN 2245	配列番号9
ggGGGACGACGTCGTCgggggG	ODN 2246	配列番号10
ggGGGACGAGCTCGTCgggggG	ODN 2247	配列番号11
ggGGGACGTACGTCgggggG	ODN 2248	配列番号12
ggGGGACGATCGTTgggggG	ODN 2252	配列番号13
ggGGAACGATCGTCgggggG	ODN 2253	配列番号14
ggGGGACGATCGTCgggggG	ODN 2254	配列番号15
ggGGGACGATCGTCgggggG	ODN 2255	配列番号16
ggGGGTCATCGATGAaggggG	ODN 2260	配列番号17
ggGGTCGTCGACGAaggggG	ODN 2293	配列番号18
ggGGTCGTTTGAACGAaggggG	ODN 2294	配列番号19
ggGGACGTTTGAACGTgggggG	ODN 2295	配列番号20
ggGGAACGACGTCGTTgggggG	ODN 2297	配列番号21
ggGGAACGTACGTCgggggG	ODN 2298	配列番号22
ggGGAACGTACGTACGTTgggggG	ODN 2299	配列番号23
ggGGTCACCGGTGAaggggG	ODN 2300	配列番号24
ggGGTCGACGTACGTCGAaggggG	ODN 2301	配列番号25
ggGGACCGGTACCGGTgggggG	ODN 2302	配列番号26
ggGTCGACGTCGAaggggG	ODN 2303	配列番号27
ggGGTCGACGTCGagggg	ODN 2304	配列番号28
ggGGAACGTTAACGTTgggggG	ODN 2305	配列番号29
ggGGACGTCGACGTgggggG	ODN 2306	配列番号30
ggGGGTCGTTTCGTTgggggG	ODN 2311	配列番号31
ggGACGATCGTCGgggggG	ODN 2328	配列番号32
ggGTCGTCGACGAagggggG	ODN 2329	配列番号33
ggTCGTCGACGAGgggggG	ODN 2330	配列番号34
ggGGACGATCGTCGgggggG	ODN 2332	配列番号35
ggGGTCGACGTCGACGTCGAGgggggG	ODN 2334	配列番号36、および
ggGGACGACGTCGTCGgggggG	ODN 2336	配列番号37、

からなる群より選択される配列を有する単離された核酸であって、

ここで各小文字が、ホスホロチオエート結合を示し、そして各大文字が、ホスホジエステル結合を示す、

単離された核酸。

【請求項202】 以下：

【化13】

ggGGTCAACGTTGAgggggG	ODN 1585	配列番号1
tcgtcgtttgtcgtttgtcgtt	ODN 2022	配列番号2
ggggtcgtcgttttgggggg	ODN 2184	配列番号3
tcgtcgtttgtcgtttgggggg	ODN 2185	配列番号4
ggggtcgacgtcgaggggggg	ODN 2192	配列番号5
ggggtcacgaaggggggg	ODN 2204	配列番号6
ggGGGACGATCGTCggggggG	ODN 2216	配列番号7
gggggtcgtacgacgggggg	ODN 2217	配列番号8
ggGGGACGATATCGTCggggggG	ODN 2245	配列番号9
ggGGGACGACGTCGTCggggggG	ODN 2246	配列番号10
ggGGGACGAGCTCGTCggggggG	ODN 2247	配列番号11
ggGGGACGTACGTCggggggG	ODN 2248	配列番号12
ggGGGACGATCGTTGggggG	ODN 2252	配列番号13
ggGGAACGATCGTCggggggG	ODN 2253	配列番号14
ggGGGACGATCGTCggggggG	ODN 2254	配列番号15
ggGGGACGATCGTCGggggggG	ODN 2255	配列番号16
ggGGGTCATCGATGAgggggG	ODN 2260	配列番号17
ggGGTCGTCGACGAgggggG	ODN 2293	配列番号18
ggGGTCGTTTCAACGAgggggG	ODN 2294	配列番号19
ggGGACGTTTCAACGTggggggG	ODN 2295	配列番号20
ggGGAACGACGTCGTTggggggG	ODN 2297	配列番号21
ggGGAACGTACGTCggggggG	ODN 2298	配列番号22
ggGGAACGTACGTACGTTggggggG	ODN 2299	配列番号23
ggGGTCACCGGTGAgggggG	ODN 2300	配列番号24
ggGGTCGACGTACGTCGAgggggG	ODN 2301	配列番号25
ggGGACCGGTACCGGTggggggG	ODN 2302	配列番号26
ggGTCGACGTGAgggggG	ODN 2303	配列番号27
ggGGTCGACGTGAgggggG	ODN 2304	配列番号28
ggGGAACGTTAACGTTggggggG	ODN 2305	配列番号29
ggGGACGTGACGTggggggG	ODN 2306	配列番号30
ggGGGTCGTTTCGTTggggggG	ODN 2311	配列番号31
ggGACGATCGTCGggggggG	ODN 2328	配列番号32
ggGTCGTCGACGAgggggggG	ODN 2329	配列番号33
ggTCGTCGACGAGggggggG	ODN 2330	配列番号34
ggGGACGATCGTCGggggggG	ODN 2332	配列番号35
ggGGTCGACGTGACGTCGAGggggggG	ODN 2334	配列番号36、および
ggGGACGACGTGTCGTCGggggggG	ODN 2336	配列番号37、

からなる群より選択される配列を有する単離された核酸であって、ここで各小文字が、ホスホロチオエート結合を示し、そして各大文字が、ホスホジエステル結合を示す、単離された核酸；および

薬学的に受容可能なキャリア、を含む薬学的組成物。

【請求項203】 IFN- α をさらに含む、請求項202に記載の薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の背景)

白血球インターフェロンおよび α インターフェロンとしても公知であるヒトインターフェロン α (IFN- α) は、抗ウイルス活性、抗増殖活性および免疫調節活性を有する細胞外シグナル伝達タンパク質のファミリーを含む。同定されそして特徴付けられたインターフェロンの第1の型 (IFN- α) は、臨床適用のために最も広範に使用されるインターフェロンのままである。

【0002】

IFN- α は、I型インターフェロンファミリーのメンバーであり、これはまた、IFN- β 、 ω (白血球 (II)) インターフェロンおよび τ (栄養膜) インターフェロンを含む。 ω インターフェロンおよび τ インターフェロンは、臨床的には使用されない。IFN- β (線維芽細胞インターフェロンとしても公知である) は、良好に特徴づけられているが、臨床的にはIFN- α より利用されていない。線維芽細胞は、IFN- β の優性な細胞性プロデューサーである。IFN- β は、多発性硬化症の再発性形態を処置するために米国において認可されている。インターフェロン γ (IFN- γ) (γ インターフェロンとしても公知である) は、唯一の既知のII型インターフェロンである。IFN- γ は、活性化Tリンパ球により産生されそしてTh1免疫応答の確立において重要な役割を果たす。その治療的用途は限定される。米国においては、ヒトIFN- γ は、慢性肉芽腫症を伴う感染の頻度および重症度を減少させるために認可されている。

【0003】

IFN- α 自体は、1ダースを超える関連した相同タンパク質 (アイソフォーム、表1) のファミリーを示し、各々は、特有の遺伝子によりコードされ、そして各々は、特有の活性プロファイルを示す。ウイルスに対する異なる α インターフェロン種の活性は、12倍以上も変化し得る。

【0004】

臨床的使用におけるIFN- α 生成物は、単一のアイソフォームの、組換えタンパク質または高度に精製された天然のタンパク質である。組換えIFN- α は

、種々の腫瘍およびウイルス性疾患の処置における使用について認可されている（表2）。

【0005】

最近まで、Bリンパ球は、IFN- α の優性プロデューサーであると考えられていた。最近、新たな細胞型が、末梢血においてI型インターフェロン生成の主要な供給源として同定された。これらの以前は同定されていなかった「天然インターフェロン産生細胞」（IPC）は、ウイルス感染に際して、非常に大量のI型IFNを合成し得る稀なCD4⁺/MHC クラスII⁺集団（末梢血単核細胞（PBMC）内で1：1000）として長年記載されていた。Cella Mら、Nat Med 5：919（1999）；Galy Aら Blood 95：128（2000）；Siegal FPら Science 284：1835（1999）。末梢血からのIPCの単離後、IL-3は、この細胞型の生存に必要とされる。

【0006】

（表1．ヒトIFN- α のファミリー）

【0007】

【表1】

IFN- α A	(IFN- α 2a)
IFN- α 2	(IFN- α 2b)
IFN- α 4b	(IFN- α 4)
IFN- α B2	(IFN- α 8)
IFN- α C	(IFN- α 10)
IFN- α D	(IFN- α 1)
IFN- α F	(IFN- α 21)
IFN- α G	(IFN- α 5)
IFN- α H2	(IFN- α 14)
IFN- α I	(IFN- α 17)
IFN- α J1	(IFN- α 7)
IFN- α K	(IFN- α 6)
IFN- α M1	
IFN- α N	
IFN- α WA	(IFN- α 16)

(表2. IFN- α の現在の臨床認可)

【0008】

【表2】

米国において認可された	米国外で認可された
慢性B型肝炎	多発性骨髄腫
慢性C型肝炎	腎細胞癌
ヘアリーセル白血病	膀胱細胞癌
皮膚T細胞白血病	結腸癌
慢性骨髄性白血病	子宮頸部形成異常
非ホジキンリンパ腫	喉頭乳頭腫症
悪性黒色腫についてのアジュバント治療	
カポジ肉腫 (AIDS関連)	
尖圭コンジローマ (性病性疣贅)	

樹状細胞 (DC) は、新抗原に対する免疫応答のプライミングにおいて重要な役割を果たすと考えられる。Banchereau Jら、Nature 392:245 (1998)。最近の証拠は、ヒト末梢血中のいくつかの異なるDCサブタイプの存在を示唆する。Zhong RKら J Immunol 163:1254 (1999)。DCのこれらのサブタイプは、骨髄様DC (mDC) およびプラズマ細胞様DC (pDC、DC2細胞としても公知) を含む。前駆体樹状細胞は、2つのサブセット (CD11c⁺/CD123⁺/- 集団 (mDCの前駆体) およびCD11c⁻/CD123⁺⁺ 集団 (pDCの前駆体)) を含む。後者は最近非常に注目された。なぜなら、これは、天然のI型IFN産生細胞 (IPC) と同一であることが報告されたからである。O'Doherty Uら J Exp Med 178:1067 (1993); Grouard Gら J Exp Med 185:1101 (1997); Thomas Rら J Immunol 153:4016 (1994)。成熟に際して、この細胞型は、DCの特徴的な特色を発達させる。O'Doherty Uら J Exp Med 178:1067 (1993); Thomas Rら J Immunol 153:4016 (1994); Galy Aら Blood 95

: 128 (2000); Chehimi Jら Immunology 68: 488. (1989)。

【0009】

正常な個体におけるPBMCにおけるIPCの頻度は、0.2%と0.6%との間で変化する。これらは、系統マーカーCD3 (T細胞)、CD14 (単球)、CD9 (B細胞) およびCD56 (NK細胞) の非存在により、CD11cの非存在により、そしてCD4、CD123 (IL-3レセプター α 、IL-3R α) およびMHCクラスIIのそれらの発現により特徴付けられる。Grouard Gら J Exp Med 185:1101-11 (1997); Risssoan M-Cら Science 283:1183-6 (1999); Siegal FPら Science 284:1835-7 (1999); Cella Mら Nat Med 5:919-23 (1999)。形態学的にIPCは、リンパ球と似ている。IPCは、磁気ビーズ活性化細胞分類(MACS)と蛍光活性化細胞分類(フローサイトメトリー、FACS)との組み合わせによりPBMCから単離され得る。IL-3の添加なしでは、ほとんどのIPCは、細胞培養の3日以内に死滅する。ヘルペス単純ウイルス(HSV, Siegal FPら Science 284:1835-7 (1999))またはインフルエンザウイルス(Cella Mら Nat Med 5:919-23 (1999))でのIPCの感染は、バイオアッセイ(水疱性口内炎ウイルスに対する線維芽細胞の防護)により測定する場合、大量のI型インターフェロンの産生を導く。

【0010】

遺伝暗号を運搬する際のその役割の他に、DNAは、シグナル伝達分子として機能することが最近示されている(Krieg AM、1998、Biodrugs)。高等真核生物の免疫系は、特に塩基内容で、非メチル化CpGジヌクレオチドの関係に基づいて原核生物核酸を検出するための機構を進化させたようである。Krieg AMら Nature 374:546-9 (1995)。非メチル化CpGジヌクレオチドは、細菌DNAに共通であるが、脊椎動物DNAにおいて比重分に提示され(「CpG抑制」)、そしてメチル化される。Bi

rd AP Trends in Genetics 3:342 (1987)。
免疫刺激性塩基関係におけるこれらの非メチル化CpGジヌクレオチドを含むDNA(「CpGモチーフ」)はB細胞活性化を誘導することによる体液性免疫、活性化誘導アポトーシスに対する耐性、ならびにIL-6およびIgM分泌を誘発する。Krieg AMら Nature 374:546-9 (1995) ; Yi AKら J Immunol 157:5394 (1996) ; およびKlinman Dら Proc Natl Acad Sci USA 93:2879 (1996)。このようなCpG DNAはまた、単球およびマクロファージを直接活性化してTh1様サイトカインを分泌する。Ballas ZKら J Immunol 157:1840 (1996) ; Cowdery JSら J Immunol 156:4570 (1996) ; およびHalperin MDら Cell Immunol 167:72 (1996)。これは、ナチュラルキラー(NK)細胞溶解活性の活性化およびIFN- γ 分泌を導く。Ballas ZKら J Immunol 157:1840 (1996) ; Cowdery JSら J Immunol 156:4570 (1996) ; およびChace JH Clin Immunol Immunopath 84:185-93 (1997)。

【0011】

Yamamotoらは、Mycobacterium bovis (BCG) から抽出した核酸画分(MY-1と称した)がインビトロでI型インターフェロンを含むことを1988年の彼らの知見において報告した。Yamamoto Sら Jpn J Cancer Res 79:866-73 (1988)。引き続き、Tokunagaらは、3つの無作為に選択された公知のBCGタンパク質をコードするcDNAに存在する配列を有する45マーのオリゴヌクレオチドのパネルを引き続いて合成し、そして1つの配列(BCG-A4)がマウス脾細胞懸濁液中でのI型IFNの潜在的なインデューサーであることを見出した。Tokunaga Tら Microbiol Immunol 36:55-66 (1992)。5'の30マーのフラグメント(BCG-A4a)は、インタクトな45マーのBCG-A4と同様にIFNの強力なインデューサーであ

ることが報告された。

【0012】

【化14】

BCG-A4 ACCGATGACGTCGCCGGTGACGGCACCACGACGGCCACCGTGCTG (配列番号 163)

BCG-A4a ACCGATGACGTCGCCGGTGACGGCACCACG (配列番号 164)

次いで、これらの研究者は、IFNを誘導する全てのオリゴヌクレオチドが、ヘキサマーパリンδροーム配列のGACGTC (BCG-A4およびBCG-A4aに存在する)、AGCGCT、およびAACGTTを含むが、ACCGGTを含まないことを報告した。Yamamoto Sら J Immunol 148:4072-6 (1992)。次いで、Kimuraらは、ヘキサマーパリンδροームAACGTTならびにオリゴA、オリゴC、オリゴTおよびオリゴG末端を含む30マーのホスホジエステルオリゴデオキシヌクレオチド(ODN)の中でも、後者(

【0013】

【化15】

GGGGGGGGGGGAACGTTGGGGGGGGGGGG; 配列番号 165

)が、マウス脾細胞懸濁液において最も強力なI型IFNのインデューサーであったことを見出した。Kimura Yら J Biochem (Tokyo) 116:991-4 (1994)。

【0014】

最近、驚くべきことに、ヒトB細胞に対して最も強力な活性を有するCpG ODN配列が、PBMCにおける検出可能なレベルのI型IFNを誘導しないことが発見された。Hartmann Gら J Immunol 164:1617-24 (2000)。

【0015】

(発明の要旨)

本発明に従って、特定の免疫刺激核酸 (ISNA) がIPCの生存および刺激の両方を促進するための単一の薬剤として特に適切であることが発見された。特定のISNAが、IPC生存のためのIL-3の必要性およびIPC活性化のためのウイルス感染の必要性を取り除くこともまた、本発明に従って発見された。

【0016】

さらに、驚くべきことに、特定のCpG ISNAが、大量のI型IFNの産生を誘導するが、B細胞の活性化には最小限の効果しか有さず、一方、特定の他のCpG ISNAはヒトB細胞およびIPCを強力に活性化するが、I型IFNの誘導には最小限の効果しか有さないことが本発明に従って発見された。驚くべきことに、I型IFNの強力なインデューサーであるCpG ISNAがYamamotoおよび同僚により記載されたヘキサマーパリンδροームのGACGTC、AGCGCTまたはAACGTTを必ずしも含まないことが発見された。Yamamoto Sら J Immunol 148:4072-6 (1992)。

【0017】

これらの発見は、IFN- α の使用を必要とする臨床的適用のための治療剤としての、ISNA、そして特に特定のCpG ISNAの使用への道を開放する。臨床的戦略は、ISNAの局所的および全身的なインビボ投与、ならびにインビトロのISNA活性化単離IPCが局所的または全身的に患者へ再注入されるエキソビボ戦略を含む。これらの治療戦略は、他の増殖因子 (IL-3、GM-CSF、flt-3リガンドなど) との組み合わせ、ならびに他の刺激 (スーパー抗原、ウイルス性産物) との組み合わせを含む。I型IFNのインデューサーである本発明のCpG ISNAはまた、IPCに由来する恒久細胞株を使用する天然インターフェロンのインビトロ産性を可能にする。天然IFN- α は1ダースを超える別々の遺伝子産物のファミリーであるので、これらの個々の産物は、独特の活性プロファイルを有し、天然インターフェロンの臨床的使用は、単一組換えIFN- α 遺伝子由来の組換えIFN- α と比

較して好ましくあり得る。

【0018】

驚くべきことに、I型IFNが $\gamma\delta$ T細胞と呼ばれるTリンパ球のサブセットを活性化することもまた、本発明に従って発見された。さらに、I型IFNの強力なインデューサーであることを伴わないB細胞およびpDCの強力なアクチベーターであるCpG ODNではなく、I型IFNの強力なインデューサーであるCpG ODNが、末梢血単核細胞(PBMC)の集団内に存在する $\gamma\delta$ T細胞を活性化し得ることが、本発明に従ってさらに発見された。特定の理論に固執することなく、I型IFN誘導CpG ODNが、これもまたPBMCに存在するIPCによるI型IFN分泌を誘発するそれらの能力によりPBMC内に存在する $\gamma\delta$ T細胞を活性化し得ることは明らかであるようである。

【0019】

驚くべきことに、 $\gamma\delta$ T細胞を活性化する能力に加えて、I型IFNの強力なインデューサーであることを伴わないB細胞およびpDCの強力なアクチベーターであるCpG ODNではなく、I型IFN誘導CpG ODNが、PBMCの集団内に存在する抗原活性化 $\gamma\delta$ T細胞の増殖を増強し得ることが、本発明に従って発見された。特に、増殖は、特定の非ペプチド性抗原(例えば、ホスホ抗原イソペンテニルピロホスフェート(IPP))の存在と組み合わせで増強され得る。

【0020】

驚くべきことに、IPPと組み合わせた特定のCpG ODNが、IFN- γ および $\gamma\delta$ T細胞中のパーフォリンの産性を相乗的に誘導することが、本発明に従って発見された。

【0021】

本発明に従う別の驚くべき発見において、I型IFNの強力なインデューサーであることを伴わないB細胞およびpDCの強力なアクチベーターであるCpG ODNではなく、I型IFN誘導CpG ODNが、PBMCにおけるCD40刺激IL-12産生をブロックし得ることが見出された。さらに、驚くべきことに、I型IFNの強力なインデューサーとなることなしにB細胞およびp

DCの強力なアクチベーターであるCpG ODNが、反対の効果を有したこと（すなわち、これらのODNは実際にPBMCにおけるCD40刺激IL-12産生を増強した）が見出された。

【0022】

I型IFNの強力なインデューサーであることを伴わずにB細胞およびpDCの強力なアクチベーターであるCpG ODNが、I型IFNの潜在的なインデューサーであるCpG ODNよりも、抗原特異的プライミングのより良好なプロモーターであり、そしてヒト細胞障害性Tリンパ球（CTL）を必要とすることが、本発明に従ってさらに発見された。

【0023】

本発明の1つの局面に従って、改良が、被検体へのIFN- α の投与を含む治療に提供される。この改良は、有効量の単離されたISNAを同時投与することを含む。1つの実施形態では、IFN- α は、IFN- α 単独について臨床的に確立された有効量で投与される。別の実施形態では、IFN- α は、IFN- α 単独について臨床的に確立された有効量未満で投与される。IFN- α はまた、オリゴヌクレオチドの非存在下でIFN- α についての最大許容量で投与され得る。他の実施形態では、IFN- α は、IFN- α の最大許容量またはIFN- α 単独について臨床的に確立された有効量の20%未満、30%未満、40%未満、または50%未満でさえも投与される。

【0024】

いくつかの実施形態では、ISNAは、CpG核酸である。他の実施形態では、ISNAは、非CpG核酸である（すなわち、ISNAは、CpG核酸ではない）。1つの実施形態における非CpG核酸は、Tに富む核酸である。別の実施形態では、非CpG核酸は、ポリ-G核酸である。なお別の実施形態では、免疫刺激核酸は、CpG核酸、Tに富む核酸およびポリ-G核酸を含む群より選択される少なくとも2つの核酸の任意の組み合わせである。

【0025】

いくつかの実施形態では、ISNAは改変される。特定の実施形態では、ISNAは、少なくとも1つのヌクレアーゼ耐性分子内結合を有する改変された骨格

を有する。ヌクレアーゼ耐性ヌクレオチド間結合は、ホスホロチオエート結合、ホスホロジチオエート結合、メチルホスホネート結合およびペプチド結合を含む群から選択され得る。特定の実施形態では、改変ISNAは、少なくとも1つのヌクレオチドアナログまたは少なくとも1つのヌクレオチドアナログを含む。特定の実施形態では、ISNAはパリンδροームであり、一方、他の実施形態では、ISNAはパリンδροームではない。いくつかの好ましい実施形態では、ISNAは8ヌクレオチド長と100ヌクレオチド長との間であり、一方、他の好ましい実施形態では、ISNAは12ヌクレオチド長と40ヌクレオチド長との間である。好ましいサイズ、配列および改変は、以下に詳細に記載されている。

【0026】

特定の好ましい実施形態では、ISNAは、式5' Y₁ N₁ C G N₂ Y₂ 3' (ここでY₁およびY₂は、互いに独立して、1と10との間のヌクレオチドを有する核酸分子であり、そしてここでY₁は、少なくとも1つの改変されたヌクレオチド間結合を含み；Y₂は、少なくとも1つの改変されたヌクレオチド間結合を含み；そしてN₁およびN₂は、0と20との間のヌクレオチド(いくつかの実施形態では、3と8との間のヌクレオチド)を有する、互いに独立した核酸分子であるが、ここでN₁ C G N₂は、全部で少なくとも6ヌクレオチドを有し、かつここでN₁ C G N₂は、ホスホジエステル骨格を有する)により例示されるキメラCpG ODNである。

【0027】

特定の好ましい実施形態では、ISNAは、以下：

【0028】

【化16】

tcgtcgtttgtcgtttgtcgtt	ODN 2022	配列番号2
ggggcgtcgtttggggg	ODN 2184	配列番号3
tcgtcgtttgtcgtttggggg	ODN 2185	配列番号4
ggggcgtcgtcgtcggggg	ODN 2192	配列番号5
ggggcgtcgtcgtcggggg	ODN 2204	配列番号6
ggGGACGATCGTCgggggG	ODN 2216	配列番号7
ggggcgtcgtcgtcggggg	ODN 2217	配列番号8
ggGGACGATATCGTCgggggG	ODN 2245	配列番号9
ggGGACGACGTCGTCgggggG	ODN 2246	配列番号10
ggGGACGAGCTCGTCgggggG	ODN 2247	配列番号11
ggGGACGTACGTCgggggG	ODN 2248	配列番号12
ggGGACGATCGTTGggggG	ODN 2252	配列番号13
ggGAAACGATCGTCgggggG	ODN 2253	配列番号14
ggGGGACGATCGTCgggggG	ODN 2254	配列番号15
ggGGACGATCGTCgggggG	ODN 2255	配列番号16
ggGGTCATCGATGAggggG	ODN 2260	配列番号17
ggGTCGTCGACGAggggG	ODN 2293	配列番号18
ggGTCGTTTCAACGAggggG	ODN 2294	配列番号19
ggGACGTTTCAACGTgggggG	ODN 2295	配列番号20
ggGAAACGACGTCGTTgggggG	ODN 2297	配列番号21
ggGAAACGTACGTCgggggG	ODN 2298	配列番号22
ggGAAACGTACGTACGTTgggggG	ODN 2299	配列番号23
ggGTCACCGGTGAggggG	ODN 2300	配列番号24
ggGTCGACGTACGTCGAggggG	ODN 2301	配列番号25
ggGACCGGTACCGGTgggggG	ODN 2302	配列番号26
ggGTCGACGTCGAggggG	ODN 2303	配列番号27
ggGTCGACGTCGAggggG	ODN 2304	配列番号28
ggGAAACGTAAACGTTgggggG	ODN 2305	配列番号29
ggGACGTCGACGTgggggG	ODN 2306	配列番号30
ggGGTCGTTTCGTTgggggG	ODN 2311	配列番号31
ggGACGATCGTCGgggggG	ODN 2328	配列番号32
ggGTCGTCGACGAgggggG	ODN 2329	配列番号33
ggTCGTCGACGAgggggG	ODN 2330	配列番号34
ggGGACGATCGTCGgggggG	ODN 2332	配列番号35
ggGGTCGACGTCGACGTCGAgggggG	ODN 2334	配列番号36、および
ggGQACGACGTCGTCgggggG	ODN 2336	配列番号37、

(ここで、各小文字は、ホスホロチオエート結合を示し、そして各大文字は、ホスホジエステル結合を示す) に対応する配列を有する。

【0029】

特定のより好ましい実施形態では、ISNAは以下：

【0030】

【化17】

ggGGGACGAGCTCGTCgggggG (ODN 2247; 配列番号 11),
 ggGGGACGATCGTCGgggggG (ODN 2255; 配列番号 16),
 ggGGACGTTCTGAACGTgggggG (ODN 2295; 配列番号 20),
 ggGGTCGACGTCGACGTCGAGgggggG (ODN 2334; 配列番号 36),
 ggGGACGACGTCGTGgggggG (ODN 2336; 配列番号 37),

(ここで、各小文字は、ホスホロチオエート結合を示し、そして各大文字は、ホスホジエステル結合を示す) に対応する配列を有する。

【0031】

1つの実施形態では、改良は、被検体へ顆粒球-単球コロニー刺激因子(GM-CSF)を同時投与することを含む。

【0032】

別の実施形態では、被検体は、増殖性障害およびウイルス感染からなる群より選択される状態を有する。1つの実施形態では、被検体は、増殖性障害(例えば、ヘアリーセル白血病、慢性骨髄性白血病、皮膚T細胞白血病、多発性硬化症、濾胞性リンパ腫、扁平上皮細胞癌、悪性腫瘍、AIDS関連カポジ肉腫、腎細胞癌、前立腺癌、膀胱細胞癌、終脳形成異常および結腸癌)を有する。別の実施形態では、被検体は、ウイルス感染(例えば、B型肝炎、C型肝炎、尖圭コンジローム、ヒト免疫不全ウイルス、疱疹、サイトメガロウイルス、エプスタイン-バーウイルスおよびパピローマウイルス)を有する。

【0033】

本発明の別の局面に従って、方法は、被検体のIFN- α 処置を補足するために提供される。本発明のこの局面は、有効量の本発明のIFN- α およびISNAをIFN- α 処置を必要とする被検体に投与することを含む。本発明のこの局面に従う、IFN- α の処置のためのIFN- α 用量、ISNA、併用治療およびIFN- α での処置を必要とする状態は、上記のとおりである。

【0034】

本発明の別の局面に従って、方法は、被検体を処置してその被検体のIPCを活性化するために提供される。この方法は、このような処置を必要とする被検体

からIPCを単離する工程、単離されたIPCをインビトロで培養する工程、このIPCを有効量の単離されたISNAとインビトロで接触させる工程、およびこの接触させた細胞を被検体に戻す工程を包含する。この細胞はまた、インビトロで増殖因子またはサイトカインと接触され得る。1つの実施形態では、方法は、IPC細胞をIL-3またはGM-CSFとインビトロで接触させる工程を包含する。別の実施形態では、この細胞は、IL-3またはGM-CSFの非存在下でインビトロで培養される。本発明のこの局面に従って、IFN- α での処置に必要とされるISNAおよび条件は、上記されるとおりである。

【0035】

本発明の別の局面に従って、被験体のIFN- α 処置の効力を増加させるための方法が提供される。この方法は、IFN- α による処置の必要な被験体に、IFN- α を含む薬学的組成物を投与する工程、および投与されたIFN- α と共に、効果的なIFN- α 処置である量のISNAを含む薬学的組成物を被験体に同時投与する工程を包含する。IFN- α 処置の効力は、ISNAを同時投与しない場合のIFN- α と同じ量を投与する効力より大きい。本発明のこの局面に従うISNAおよびIFN- α による処置を必要とする状態は上に記載されるとおりである。1つの実施形態において、薬学的組成物は局所的に投与される。

【0036】

本発明の別の局面に従って、被験体の効果的な処置のために必要なIFN- α の用量を減らすための方法が提供される。この方法は、IFN- α による処置を必要とする患者にIFN- α を含む薬学的組成物を投与する工程、および被験体にISNAを含む薬学的組成物を同時投与する工程を包含する。投与されたIFN- α の量は、ISNAの同時投与しない場合と同じ治療的利点を達成するために必要とされるIFN- α より少ない。特定の実施形態において、投与されるIFN- α 量は、免疫刺激核酸の同時投与しない場合に必要とされるIFN- α 量より少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、または少なくとも50%さえも少ない。ISNAを含む薬学的組成物は、局所的に投与され得る。本発明のこの局面に従うISNAおよびIFN- α による処置を必要とする状態は上に記載されるとおりである。

【0037】

本発明の別の局面に従って、IFN- α による処置を受けているかまたは必要とする被験体におけるIFN- α 処置に関連する副作用を避けるための方法が提供される。この方法は、処置が必要な被験体に、IFN- α 薬学的組成物、および投与されたIFN- α と一緒にあって効果的なIFN- α 処置となる量の免疫刺激核酸含む薬学的組成物を投与する工程を包含する。IFN- α 処置に関連する副作用は、ISNAの同時投与を伴わずにIFN- α が投与される場合の副作用と比較して、減少される。IFN- α 処置に関連する副作用は全身的であり得る。この方法によって防がれるIFN- α に関連する副作用は、インフルエンザ様症状、発熱、頭痛、悪寒、筋肉痛、疲労、食欲不振、吐気、嘔吐、下痢、およびうつ病のいずれか1つを含み得る。ISNAを含む薬学的組成物は、局所的に投与され得る。本発明のこの局面に従うISNAおよびIFN- α による処置を必要とする状態は上に記載されるとおりである。

【0038】

本発明の別の局面に従って、このような処置が必要な患者におけるIFN- α 処置の効力を増強するための方法が提供される。この方法は、このような処置が必要な被験体に、状態を処置するためのIFN- α を含む有効量の薬学的組成物を投与する工程、ドナーから天然のIFN産生細胞を単離する工程、IFN産生細胞にIFN- α を放出させるのに有効な量のISNAに、単離されたIFN産生細胞をエキソピボで接触させる工程、および接触させた細胞を被験体に投与する工程を包含する。ドナーは、被験体であってもよいが、被験体である必要はない。この方法は、抗原に単離された細胞を接触させる工程をさらに含み得る。細胞の投与は、この方法の目的に適切な任意の様式でなされ得、そして局所的な注射を含み得る。局所的な注射は、標的組織を供給する血管を介され得る。この血管は、とりわけ、肝動脈、門脈、腹腔動脈、および脾動脈から、選択され得る。本発明のこの局面に従うISNAおよびIFN- α による処置を必要とする状態は上に記載されるとおりである。

【0039】

本発明の別の局面に従って、インビトロでIPCの生存を支持するための方法

が提供される。この方法は、被験体からこのような細胞を単離する工程、組織培養に適切な無菌培地において細胞を培養する工程、およびIL-3の非存在下で細胞の増殖を支持するのに有効な量のISNAと細胞とをインビトロで接触させる工程を包含する。好ましい実施形態において、細胞は、前駆体2型樹状細胞であり得る。培養条件はまた、IL-3なし、および／もしくはGM-CSFなしから選択され得るか、あるいは培養条件はIL-3、GM-CSF、もしくは他の増殖因子およびサイトカインを含み得る。本発明のこの局面に従うオリゴヌクレオチド、配列、改変体など含む好ましいISNAは、上に記載されるとおりである。

【0040】

本発明の別の局面により、単離したIPCをインビトロで刺激するための方法が提供される。その方法は、被験体からこのような細胞を単離する工程、組織培養に適した滅菌培地で細胞を培養する工程、および少なくとも1つのI型インターフェロンの分泌またはCD80の発現を誘導するに有効な量のISNAとその細胞とをインビトロで接触させる工程を包含する。培養条件は、インターロイキン-3、GM-CSF、または他の増殖因子およびサイトカインの存在または非存在下であり得る。ICPは、2型樹状突起細胞の前駆体であり得る。本発明のこの局面による、オリゴヌクレオチド、配列、改変体などを含む好ましいISNAが、上記されている。

【0041】

本発明の別の局面により、少なくとも3、4、5、6、7、または8以上ものインターフェロンサブタイプのアレイの生成を刺激する方法が提供される。その方法は、IFN産生細胞とISNAを接触させる工程を包含する。細胞は、単離されていていてもされていなくてもよい。接触工程は、インビボまたはインビトロであり得る。本発明のこの局面によるオリゴヌクレオチド、配列、改変体などを含む好ましいISNAが、本明細書中に記載されている。

【0042】

本発明の別の局面により、IL-12生成を阻害するための方法が提供される。その方法は、IL-12産生細胞が通常IL-12を産生する条件でインター

フェロン産生細胞の存在下で、I型インターフェロンの分泌を誘導するに有効な量の免疫刺激核酸とIL-12産生細胞とを接触させる工程を包含する。特定の実施形態において、免疫刺激核酸は配列番号1～37の少なくとも1つを含む。

【0043】

本発明のなお別の局面により、 $\gamma\delta$ T細胞を活性化するための方法が提供される。1つの実施形態において、その方法は、 $\gamma\delta$ T細胞とI型IFNとを接触させる工程を包含する。別の実施形態において、その方法は、I型IFNを誘導するに有効な量の免疫刺激核酸とインターフェロン産生細胞を含む細胞の集団中の $\gamma\delta$ T細胞とを接触させる工程を包含する。

【0044】

別の局面において、本発明は、 $\gamma\delta$ T細胞の増殖を促進する方法を提供する。その方法は、 $\gamma\delta$ T細胞と免疫刺激核酸の非存在下よりも存在下においてより大きな増殖応答を誘導するに有効な量の免疫刺激核酸および $\gamma\delta$ T細胞増殖の誘導物質とを接触させる工程を包含する。特定の実施形態において、免疫刺激核酸は、CpG核酸である。好ましい実施形態において、免疫刺激核酸は、配列番号1～37の中から選択される。いくつかの実施形態における $\gamma\delta$ T細胞増殖の誘導物質はリン酸抗原、好ましくはIPPである。

【0045】

別の局面において、本発明は、以下を含む群より選択される配列を有する単離された核酸を提供する：

【0046】

【化18】

tcgtcgtttgtcgtttgtcgtt	ODN 2022	配列番号2
ggggcgtcgtttggggg	ODN 2184	配列番号3
tcgtcgtttgtcgtttggggg	ODN 2185	配列番号4
ggggcgcgcgcgcgggggg	ODN 2192	配列番号5
ggggcgcgcgcgcgggggg	ODN 2204	配列番号6
ggGGGACGATCGTCgggggG	ODN 2216	配列番号7
gggggctcgcgcgcgggggg	ODN 2217	配列番号8
ggGGGACGATATCGTCgggggG	ODN 2245	配列番号9
ggGGGACGACGTCGTCgggggG	ODN 2246	配列番号10
ggGGGACGAGCTCGTCgggggG	ODN 2247	配列番号11
ggGGGACGTACGTCgggggG	ODN 2248	配列番号12
ggGGGACGATCGTTGggggG	ODN 2252	配列番号13
ggGGAACGATCGTCgggggG	ODN 2253	配列番号14
ggGGGACGATCGTCgggggG	ODN 2254	配列番号15
ggGGGACGATCGTCgggggG	ODN 2255	配列番号16
ggGGGTCATCGATGAgggggG	ODN 2260	配列番号17
ggGGTCGTCGACGAGggggG	ODN 2293	配列番号18
ggGGTCGTTTGAACGAGggggG	ODN 2294	配列番号19
ggGGACGTTTGAACGTgggggG	ODN 2295	配列番号20
ggGGAACGACGTCGTTgggggG	ODN 2297	配列番号21
ggGGAACGTACGTCgggggG	ODN 2298	配列番号22
ggGGAACGTACGTACGTTgggggG	ODN 2299	配列番号23
ggGGTCACCGGTGAgggggG	ODN 2300	配列番号24
ggGGTCGACGTACGTCGAgggggG	ODN 2301	配列番号25
ggGGACCGGTACCGGTgggggG	ODN 2302	配列番号26
ggGTCGACGTCGAgggggG	ODN 2303	配列番号27
ggGGTCGACGTCGAgggggG	ODN 2304	配列番号28
ggGGAACGTTAACGTTgggggG	ODN 2305	配列番号29
ggGGACGTCGACGTgggggG	ODN 2306	配列番号30
ggGGGTCGTTTCGTTgggggG	ODN 2311	配列番号31
ggGACGATCGTCGgggggG	ODN 2328	配列番号32
ggGTCGTCGACGAggggggG	ODN 2329	配列番号33
ggTCGTCGACGAGgggggG	ODN 2330	配列番号34
ggGGACGATCGTCGgggggG	ODN 2332	配列番号35
ggGGTCGACGTCGACGTCGAGgggggG	ODN 2334	配列番号36、および
ggGGACGACGTCGTCGgggggG	ODN 2336	配列番号37、

(ここで、各小文字はホスホロチオエート結合を表し、そして各大文字はホスホジエステル結合を示す)。

【0047】

なお別の局面において、本発明は、以下を含む群より選択される配列を有する単離された核酸を含む薬学的組成物および薬学的に受容可能なキャリアを提供する：

【0048】

【化19】

tcgtcgtttgtcgtttgtcgtt	ODN 2022	配列番号2
ggggtcgtcgtttgggggg	ODN 2184	配列番号3
tcgtcgtttgtcgtttgggggg	ODN 2185	配列番号4
ggggtcgacgacgaggggggg	ODN 2192	配列番号5
ggggtcacgatgaggggggg	ODN 2204	配列番号6
ggGGGACGATCGTCgggggG	ODN 2216	配列番号7
gggggtcgtacgacgggggg	ODN 2217	配列番号8
ggGGGACGATATCGTCgggggG	ODN 2245	配列番号9
ggGGGACGACGTCGTCgggggG	ODN 2246	配列番号10
ggGGGACGAGCTCGTCgggggG	ODN 2247	配列番号11
ggGGGACGTACGTCgggggG	ODN 2248	配列番号12
ggGGGACGATCGTTGggggG	ODN 2252	配列番号13
ggGGAACGATCGTCgggggG	ODN 2253	配列番号14
ggGGGACGATCGTCgggggG	ODN 2254	配列番号15
ggGGGACGATCGTCgggggG	ODN 2255	配列番号16
ggGGGTCATCGATGAgggggG	ODN 2260	配列番号17
ggGGTCGTCGACGAgggggG	ODN 2293	配列番号18
ggGGTCGTTTGAACGAgggggG	ODN 2294	配列番号19
ggGGGACGTTTGAACGTgggggG	ODN 2295	配列番号20
ggGGAACGACGTCGTTgggggG	ODN 2297	配列番号21
ggGGAACGTACGTCgggggG	ODN 2298	配列番号22
ggGGAACGTACGTACGTTgggggG	ODN 2299	配列番号23
ggGGTCACCGGTGAgggggG	ODN 2300	配列番号24
ggGGTCGACGTACGTCGAgggggG	ODN 2301	配列番号25
ggGGACCGGTACCGGTgggggG	ODN 2302	配列番号26
ggGGTCGACGTCGAgggggG	ODN 2303	配列番号27
ggGGTCGACGTCGAgggggG	ODN 2304	配列番号28
ggGGAACGTTAACGTTgggggG	ODN 2305	配列番号29
ggGGACGTCGACGTgggggG	ODN 2306	配列番号30
ggGGGTCGTTTCGTTgggggG	ODN 2311	配列番号31
ggGACGATCGTCGgggggG	ODN 2328	配列番号32
ggGTCGTCGACGAggggggG	ODN 2329	配列番号33
ggTCGTCGACGAggggggG	ODN 2330	配列番号34
ggGGACGATCGTCGgggggG	ODN 2332	配列番号35
ggGGTCGACGTCGACGTCGAgggggG	ODN 2334	配列番号36、および
ggGGACGACGTCGTCGgggggG	ODN 2336	配列番号37、

(ここで、各小文字はホスホロチオエート結合を表し、そして各大文字はホスホジエステル結合と薬学的に受容可能なキャリアを示す)。いくつかの実施形態において、薬学的組成物はまた、IFN- α を含む。

【0049】

本発明の別の局面により、被験体への投与のためのインターフェロン組成物が提供される。その組成物は被験体に投与するための容器中にインターフェロンを含む。容器中のインターフェロンの量は、容認される最大許容用量(MTD)より少なくとも約10%より少ない量である。好ましくは、容器中のインターフェロンの量は、MTDの少なくとも20%未満、MTDの少なくとも30%未満、MTDの少なくとも40%未満、またはさらにMTDの少なくとも50%未満で

ある。容器はまた、ISNAを含み得る。

【0050】

本発明のさらに別の局面において、被験体にインターフェロンおよびISNAを投与するためのキットが提供される。そのキットは、IFN α を含む組成物を含む容器およびMTDより少なくとも約10%少ない、MTDより少なくとも約20%少ない、MTDより少なくとも約30%少ない、MTDより少なくとも約40%少ない、またはMTDより約50%少ない量でのこのような処置を必要とする被験体にインターフェロンを投与するための説明書を含む。このキットは、同じ容器、または別の容器中にISNAを含み得る。このキットはまた、IFN α での処置に対して感受性の状態の被験体を処置するための説明書を含み得る。

【0051】

本発明の各々の限定は、本発明の種々の実施形態を包括し得る。従って、任意の1つの要素または要素の組み合わせを含む本発明の各々の限定が本発明の各々の局面に包含され得ることが予測される。

【0052】

本発明のこれらおよび他の局面は、以下により詳細に記載される。

【0053】

(発明の詳細な説明)

本発明は、血球の特定のサブセットである天然のIFN産生細胞(IPC)がISNAにより刺激され、IFN α を産生するという発見を含む。UV照射されたウイルスまたは加熱殺菌された細菌のどの構成要素が、IPCによるIFN α 産生の誘導に寄与するのか、以前は周知でなかったもので、本発見は驚くべきものであった。Siegal FPら、Science 284:1835~7(1999)。本発見はまた、IPCから生じる成熟したDC2がIFN α の強力なプロデューサーではなかったことから、驚くべきものであった。さらに、単球誘導化樹状突起細胞(DC1)がCpG核酸に対する応答においてIFN α を産生しないことはまた、公知であった。IFN α 分子のブロードなアレイが刺激されることも驚くべきものであった。さらに、本発明は、ISNA投

与部位でのIFN- α の局所的な誘導を包含し、従って、同様のIFN- α の局所的な濃度を達成するために必要な用量でのIFN- α の全身投与に関連する有毒な影響を回避する。本発明はまた、ISNAがIFN産生細胞を刺激し得、それらを活性化し、刺激分子であるCD80 (B7-1) と同時に発現するという予期しない発見を含む。別の予期しない発見は、ISNAが、インターロイキン-3の非存在下でさえ、IFN産生細胞の生存を支持し得るということである。これらの種々の発見は、本明細書中で記載されたインピボ、エキソピボ、およびインピトロでの発明をもたらした。

【0054】

ISNAは、免疫系の細胞を接触させる際に、ISNA自身が、免疫系の接触した細胞に増殖および／または活性化させ得る核酸分子である。接触させることは直接または間接であり得、例えばISNAは、第1型免疫細胞を直接的に刺激して産物を発現し得、次いで、その産物は、ISNAに曝露されないか、またはISNA第2型免疫細胞に応答性のない第2型免疫細胞を刺激する。ISNAの免疫刺激効果は、ISNAの配列により偶然にコードされ得た任意の産物とは分別される。同様に、ISNAの免疫刺激効果は、任意のアンチセンスメカニズムとは異なり、そして任意のアンチセンスメカニズムに依存しない。特定の核酸のみが、ISNAである。本来は、特定のパリンδροーム配列が免疫刺激性であると考えられた。Tokunaga Tら、Microbiol Immunol 36:55~66 (1992) ; Yamamoto Tら、Antisense Res Dev 4:119~22 (1994)。さらなる研究は、非パリンδροーム配列も免疫刺激性であることを示したが、但しそれらは、特定の配列背景(CpGモチーフ)中のCpGジヌクレオチドを含む。Krieg AMら、Nature 374:546~9 (1995)。ISNAは一本鎖または二本鎖であり得る。一般的に、二本鎖核酸分子はインピボでより安定であり、一方、一本鎖核酸分子は、増加した免疫活性を有する。従って、本発明のいくつかの局面においては、ISNAが一本鎖であることが好ましく、そして他の局面においては、ISNAが二本鎖でありことが好ましい。

【0055】

用語「核酸」および「オリゴヌクレオチド」は互換可能に使用され、複数の共有結合したヌクレオチドを意味する。ここで、各々のヌクレオチドはホスフェートおよび交換可能な有機塩基に結合した糖（例えば、リボースまたはデオキシリボース）を含み、これらは、置換ピリミジン（例えば、シトシン（C）、チミン（T）、またはウラシル（U））、または置換プリン（例えば、アデニン（A）またはグアニン（G））のいずれかである。

【0056】

本明細書中で使用される場合、用語「核酸」および「オリゴヌクレオチド」とは、オリゴリボヌクレオチドおよびオリゴデオキシリボヌクレオチドをいう。この用語はまた、ポリヌクレオチド（すなわち、ホスフェートを除いたポリヌクレオチド）および任意の他の有機塩基含有ポリマーを含む。核酸分子は現存の核酸供給源（例えば、ゲノムDNAまたはcDNA）から得られ得るが、好ましくは、合成である（例えば、オリゴヌクレオチド合成より産生される）。

【0057】

用語「核酸」および「オリゴヌクレオチド」はまた、共有結合的に改変された塩基および／または糖を有する核酸またはオリゴヌクレオチドを含む。例えば、それらは、3'位のヒドロキシル基以外および5'位のリン酸基以外の低分子量有機基に共有結合された糖の基本骨格を有する核酸を含む。従って、改変された核酸は2'-O-アルキル化されたりリボース基を含み得る。さらに、改変された核酸はリボースの代わりにアラビノースのような糖を含み得る。従って、核酸は、基本骨格の組成物において異種であり得、それによってペプチド核酸（これは、核酸塩基とともにアミノ酸基本骨格を有する）などと結合したポリマー単位の任意の可能な組み合わせを含む。いくつかの実施形態において、基本骨格の組成物において核酸は同種である。

【0058】

核酸はまた、C-5プロピン改変塩基などの塩基アナログを含み得る。Wagnerら、Nature Biotechnology 14:840~844 (1996)。プリンおよびピリミジンとしては、アデニン、シトシン、グアニン、チミン、5-メチルシトシン、2-アミノプリン、2-アミノ-6-クロロ

プリン、2, 6-ジアミノプリン、ヒポキサンチン、および他の天然に存在するか、または人工的に生じる核酸塩基、置換および非置換の芳香族部分が挙げられるが、限定ではない。

【0059】

核酸は、塩基のポリマー、核酸塩基アナログ、またはヌクレオチドに結合される。核酸の結合した単位に関して本明細書中で使用される場合、「結合した」または「結合」は、2つの要素が互いに任意の物理化学的手段により結合されることである。当業者に公知の任意の結合（共有結合または非共有結合）が含まれる。このような結合は当業者に周知である。本来、天然に見出され、核酸の個々の単位を結合している天然の結合が最も一般的である。しかし、核酸の個々の単位は、合成的結合または改変された結合により結合され得る。

【0060】

CpGオリゴヌクレオチドは、メチル化されていないCpGジヌクレオチドの少なくとも1つを含むオリゴヌクレオチドである。少なくとも1つの非メチル化されたCpGジヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドは、非メチル化されていたシトシン-グアニンジヌクレオチド配列（すなわち、5' シトシン、次いで3' グアニンを含み、そしてホスフェート結合により結合された「CpG DNA」またはDNA）を含み、そして免疫系を活性化する核酸分子である。CpGオリゴヌクレオチド全体が、非メチル化されても、または一部が非メチル化されてもよいが、少なくとも5' CG 3' のCは非メチル化されなければならない。CpGオリゴヌクレオチドは、二本鎖または一本鎖であり得る。本明細書中で使用される場合、CpGオリゴヌクレオチドまたはCpG核酸という用語は、特に示さない限り、免疫刺激CpGオリゴヌクレオチドまたは核酸をいう。

【0061】

1つの好ましい実施形態において、本発明は少なくとも以下の式で表されるCpGオリゴヌクレオチドを提供する：



ここで、X₁、X₂、X₃、およびX₄はヌクレオチドである。1つの実施形態において、X₂は、アデニン、グアニンまたはチミンである。別の実施形態において

X₃は、シトシン、アデニンまたはチミンである。

【0062】

別の実施形態において、本発明は、少なくとも以下の式で表される単離されたCpGオリゴヌクレオチドを提供する：



ここでX₁、X₂、X₃およびX₄はヌクレオチドであり、そしてNは任意のヌクレオチドでありかつN₁およびN₂は、各々約0～25のNからなる核酸配列である。1つの実施形態において、X₁X₂は以下からなる群より選択されるジヌクレオチドである：GpT、GpG、GpA、ApA、ApT、ApG、CpT、CpA、CpG、TpA、TpTおよびTpG；そしてX₃X₄は以下からなる群より選択されるジヌクレオチドである：TpT、ApT、TpG、ApG、CpG、TpC、ApC、CpC、TpA、ApAおよびCpA。好ましくは、X₁X₂はGpAまたはGpTであり、そしてX₃X₄はTpTである。他の実施形態において、X₁もしくはX₂または両方がプリンでありかつX₃もしくはX₄または両方がピリミジンであるか、またはX₁X₂がGpAでありかつX₃もしくはX₄または両方がピリミジンである。別の好ましい実施形態において、X₁X₂が以下からなる群より選択されるジヌクレオチドである：TpA、ApA、ApC、ApGおよびGpG。さらに別の実施形態において、X₃X₄は以下からなる群より選択されるジヌクレオチドである：TpT、TpA、TpG、ApA、ApG、GpAおよびCpA。別の実施形態におけるX₁X₂は、以下からなる群より選択されるジヌクレオチドである：TpT、TpG、ApT、GpC、CpC、CpT、TpC、GpTおよびCpG；X₃はAおよびTからなる群より選択されるジヌクレオチドであり、そしてX₄はヌクレオチドであるが、ここでX₁X₂がTpC、GpTまたはCpGである場合、X₃X₄はTpC、ApTまたはApCではない。

【0063】

別の好ましい実施形態において、CpGオリゴヌクレオチドは、配列5' TCN₁TX₁X₂CGX₃X₄3'を有する。いくつかの実施形態において本発明のCpGオリゴヌクレオチドは、GpT、GpG、GpAおよびApAからなる群より選択されるX₁X₂を含み、そしてX₃X₄は、ならびにTpT、CpTおよびT

p Cからなる群より選択される。

【0064】

細胞への取り込みを容易にするために、C p G含有オリゴヌクレオチドを含む I S N Aは好ましくは8～100塩基長の範囲内である。しかし、より大きな核酸は細胞内でオリゴヌクレオチドへ消化されることから、十分な免疫刺激モチーフが存在する場合、本発明に従って、8ヌクレオチド以上の任意のサイズ（さらに多くのk b単位の長さ）の核酸が、免疫応答を誘導し得る。好ましくは、I S N Aは8ヌクレオチド長と100ヌクレオチド長の間の範囲内である。いくつかの好ましい実施形態において、I S N Aは12ヌクレオチド長と40ヌクレオチド長の間である。より好ましい実施形態においてI S N Aは、8ヌクレオチド長と30ヌクレオチド長の間である。最も好ましい実施形態において、I S N Aは8ヌクレオチド長と24ヌクレオチド長の間である。

【0065】

「パリンドローム配列」は、反転した繰り返しを意味する。（すなわち、A B C D E E' D' C' B' A' のような配列（AおよびA'、BおよびB'、CおよびC'、DおよびD'ならびにEおよびE'は、通常のワトソン-クリックの塩基対を形成し得る塩基である））。インビボでは、このようなパリンドローム配列は二本鎖構造を形成し得る。1つの実施形態において、C p Gオリゴヌクレオチドは、パリンドローム配列を含む。この前後関係において使用されるパリンドローム配列とは、C p Gがパリンドロームの一部であるそのパリンドローム、そして好ましくはC p Gがパリンドロームの中心であることをいう。別の実施形態において、C p Gオリゴヌクレオチドはパリンドロームを含まない。パリンドロームを含まないC p Gオリゴヌクレオチドは、C p Gジヌクレオチドがパリンドロームの一部ではないC p Gオリゴヌクレオチドである。このようなオリゴヌクレオチドは、C p Gがパリンドロームの中心でないパリンドロームを含み得る。

【0066】

本発明のC p G核酸配列は、上記に広範囲に記載され、そしてそれぞれ1995年2月7日および1997年10月30に出願された米国出願番号08/38

6, 063号および同08/960, 774の優先権を主張するPCT公開特許出願PCT/US95/01570および同PCT/US97/19791に開示される。例示的な配列として、表3および表5に示される免疫刺激配列が挙げられるが、これに限定されない。

(表3. 例示的なCpG ISNA)

【0067】

【表3】

AACGTTCT	配列番号38
ACCATGGACGAACTGTTTCCCCTC	配列番号39
ACCATGGACGACCTGTTTCCCCTC	配列番号40
ACCATGGACGAGCTGTTTCCCCTC	配列番号41
ACCATGGACGATCTGTTTCCCCTC	配列番号42
ACCATGGACGGTCTGTTTCCCCTC	配列番号43
ACCATGGACGTA CTGTTTCCCCTC	配列番号44
ACCATGGACGTTCTGTTTCCCCTC	配列番号45
AGCTATGACGTTCCAAGG	配列番号46
ATAGGAGGTCCAACGTTCTC	配列番号47
ATCGACTCTCGAACGTTCTC	配列番号48
ATCGACTCTCGAGCGTTCTC	配列番号49
ATGACGTTCTTGACGTT	配列番号50
ATGGAAGGTCCAACGTTCTC	配列番号51
ATGGAAGGTCCAGCGTTCTC	配列番号52
ATGGACTCTCCAGCGTTCTC	配列番号53
ATGGAGGCTCCATCGTTCTC	配列番号54
CAACGTT	配列番号55
CACGTTGAGGGGCAT	配列番号56
CCAACGTT	配列番号57
GAGAACGATGGACCTTCCAT	配列番号58
GAGAACGCTCCAGCACTGAT	配列番号59
GAGAACGCTCGACCTTCCAT	配列番号60
GAGAACGCTCGACCTTCCAT	配列番号61
GAGAACGCTGGACCTTCCAT	配列番号62
GCTAGACGTTGAGCT	配列番号63
GCGTGCGTTGTGCGTTGTCGTT	配列番号64
GCTAGACGTTAGCGT	配列番号65
GCTAGACGTTAGTGT	配列番号66
GCTAGATGTTAGCGT	配列番号67
GGGGTCAACGTTGACGGGG	配列番号68
GGGGTCAGTCGTTGACGGGG	配列番号69
GTCGYT	配列番号70
TCAACGTC	配列番号71
TCAACGTT	配列番号72
TCAGCGCT	配列番号73
TCAGCGTGCGCC	配列番号74
TCAICGAT	配列番号75
TCCACGACGTTTTTCGACGTT	配列番号76
TCCATAACGTTCTGATGCT	配列番号77
TCCATAGCGTTCTAGCGTT	配列番号78
TCCATCACGTTGCTGATGCT	配列番号79
TCCATGACCGTCTGATGCT	配列番号80

表3 つゞき

TCCATGAC <u>G</u> GTCCTGATGCT	配列番号81
TCCATGAC <u>G</u> GTCCTGATGCT	配列番号82
TCCATGAC <u>G</u> GTTCTGACGTT	配列番号83
TCCATGAC <u>G</u> GTTCTGATGCT	配列番号84
TCCATG <u>C</u> C <u>G</u> GTCCTGATGCT	配列番号85
TCCATG <u>C</u> C <u>G</u> GTC <u>G</u> GTC <u>G</u> GTTTT	配列番号86
TCCATG <u>C</u> C <u>G</u> GTTGCGTTGCGTT	配列番号87
TCCATGG <u>C</u> GTCCTGATGCT	配列番号88
TCCATGT <u>C</u> GATCCTGATGCT	配列番号89
TCCATGT <u>C</u> GCTCCTGATGCT	配列番号90
TCCATGT <u>C</u> GTCCTGACGCA	配列番号91
TCCATGT <u>C</u> GTCCTGATGCT	配列番号92
TCCATGT <u>C</u> GTCCTGCTGAT	配列番号93
TCCATGT <u>C</u> GTCCTGATGCT	配列番号94
TCCATGT <u>C</u> GTTCTGTCGTT	配列番号95
TCCATGT <u>C</u> GTTTTTGT <u>C</u> GTT	配列番号96
TCCTGACGTTCTGACGTT	配列番号97
TCCTGT <u>C</u> GTTCTGTCGTT	配列番号98
TCCTGT <u>C</u> GTTCTTGT <u>C</u> GTT	配列番号99
TCCTGT <u>C</u> GTTTTTTGT <u>C</u> GTT	配列番号100
TCCTTGT <u>C</u> GTTCTGTCGTT	配列番号101
T <u>C</u> GTCGCTGTCTCCCTTCTT	配列番号102
T <u>C</u> GTCGCTGTCTGCCCTTCTT	配列番号103
T <u>C</u> GTCGCTGTTGT <u>C</u> GTTTCTT	配列番号104
T <u>C</u> GTCGTCGTCGTT	配列番号105
T <u>C</u> GTCGTTGT <u>C</u> GTTGT <u>C</u> GTT	配列番号106
T <u>C</u> GTCGTTGT <u>C</u> GTTTTGT <u>C</u> GTT	配列番号107
T <u>C</u> GTCGTTTTTGT <u>C</u> GTTTTGT <u>C</u> GTT	配列番号108
TCTCCAGC <u>G</u> GGGCGCAT	配列番号109
TCTCCAGC <u>G</u> TGCGCCAT	配列番号110
TCTTCGAA	配列番号111
TCTTCGAT	配列番号112
TGT <u>C</u> GTTGT <u>C</u> GTT	配列番号113
TGT <u>C</u> GTTGT <u>C</u> GTTGT <u>C</u> GTT	配列番号114
TGT <u>C</u> GTTGT <u>C</u> GTTGT <u>C</u> GTTGT <u>C</u> GTT	配列番号115
TGT <u>C</u> GTTTTGT <u>C</u> GTTTGT <u>C</u> GTT	配列番号116
TGT <u>C</u> GYT	配列番号117

本発明の免疫刺激核酸はまた、Tに富むモチーフを有する核酸を含む。本明細書中で使用される場合、「Tに富む核酸」は、少なくとも1つのポリT配列を含み、そして／またはTヌクレオチド残基が25%より多いヌクレオチド組成物を有する核酸である。ポリT配列を有する核酸は、5' TTTT 3' のように少なくとも4つの一列に並んだTを含む。好ましくは、Tに富む核酸は、1以上のポ

りT配列を含む。好ましい実施形態において、Tに富む核酸は2、3、4などのポリT配列を有し得る。最も高い免疫刺激性のTに富むオリゴヌクレオチドの1つは、すべてTヌクレオチド残基で構成される核酸である。他のTに富む核酸は、Tヌクレオチド残基が25%より多いヌクレオチド組成を有するが、ポリT配列を含む必要はない。これらのTに富む核酸において、Tヌクレオチド残基は他の型のヌクレオチド残基（すなわちG、C、およびA）により互いに分離され得る。いくつかの実施形態において、Tに富む核酸は、Tヌクレオチド残基が35%、40%、50%、60%、70%、80%、90%および99%より多いヌクレオチド組成物、およびその間のすべての整数%のヌクレオチド組成を有する。好ましくは、Tに富む核酸は、少なくとも1つのポリT配列および25%より多くのTヌクレオチド残基がヌクレオチド組成を有する。

【0068】

Tに富む核酸はまた、1999年9月25日に出願された米国仮特許出願第60/156,113号の優先権を主張する2000年9月25日に出願された米国出願第_____号に記載されそして特許請求されており、これは本明細書中により参考として援用される。表3に示された多くのCpG ODNはまた、ここに定義されたようなTに富む核酸である。

【0069】

多くの参考文献がまた、ポリG核酸（以下に定義される）の免疫刺激特性を記載する。PisetskyおよびReich (1993) Mol Biol Reports 18:217~221; KriegerおよびHerz (1994) Ann Rev Biochem 63:601~637; Macayaら (1993) Proc Natl Acad Sci USA 90:3745~3749; Wyattら (1994) Proc Natl Acad Sci USA 91:1356~1360; RandoおよびHogan (1998) Applied Antisense Oligonucleotide Technology、KriegおよびStein編、335~352頁; ならびにKimuraら (1994) J Biochem 116:991~994。ポリG含有オリゴヌクレオチドは、細菌感染およびウイルス感染を処置および

予防するのに有用である。

【0070】

ポリGに富むオリゴヌクレオチドが、例えば、CpGオリゴヌクレオチド、コンカナバリンA、細菌DNAなどの化合物、または13-酢酸12-ミリスチン酸ホルボール(PMA)とカルシウムイオノフォア A 23187との組み合わせ(HalperinおよびPisetsky (1995) Immunopharmacol 29:47~52)、ならびにIFN- γ の下流ブロック効果によりIFN- γ 産生を阻害することは、先行技術において以前に示唆された。例えば、Ramanathanらは、ポリGオリゴヌクレオチドがIFN- γ がそのレセプターに結合するのを阻害し、このことが、IFN- γ に応答したMHCクラスIおよびICAM-1の正常な増加を阻止する。Ramanathanら(1994) Transplantation 57:612~615。ポリGオリゴヌクレオチドはまた、リンパ球からのIFN- γ の分泌を阻害し得ることが見出された。HalperinおよびPisetsky (1995) Immunopharmacol 29:47~52。

【0071】

好ましくは、ポリG核酸は以下の式を有する核酸である：



ここで、X₁、X₂、X₃およびX₄はヌクレオチドである。好ましい実施形態において、X₃およびX₄の少なくとも1つはGである。他の実施形態においては、X₃およびX₄の両方はGである。さらに他の実施形態において、好ましい式は、5' GGGNGGG 3' または5' GGGNGGGNGGG 3' であり、ここでNは0と20の間のヌクレオチドを表す。他の実施形態において、ポリG核酸(例えば、配列番号95~114、117~121、123~130、132および133として表4に列挙される核酸)がCpGジヌクレオチド含まない。他の実施形態において、ポリG核酸(例えば、配列番号115、116、122、131、および134~136として表4に列挙される核酸)は少なくとも1つのCpGジヌクレオチドを含む。特に好ましいISNAは配列番号134、135、および136である。

(表4. ポリ-G ISNA)

【0072】

【表4】

ATGGAAGGTCCAAGGGGCTC	配列番号118
ATGGAAGGTCCAGGGGCTC	配列番号119
ATGGAAGGTCCGGGGTTCTC	配列番号120
ATGGACTCTCCGGGGTTCTC	配列番号121
ATGGACTCTGGAGGGGGCTC	配列番号122
ATGGACTCTGGAGGGGTCTC	配列番号123
ATGGACTCTGGGGGGTTCTC	配列番号124
ATGGAGGCTCCATGGGGCTC	配列番号125
GAGAAGGGGCCAGCACTGAT	配列番号126
GAGAAGGGGGGACCTTCCAT	配列番号127
GAGAAGGGGGGACCTTGGAT	配列番号128
GCATGAGGGGGAGCT	配列番号129
GCTAGAGGGAGTGT	配列番号130
GCTAGAGGGGAGGGT	配列番号131
GCTAGATGTTAGGGG	配列番号132
GGGGGACGATCGTCGGGGGG	配列番号133
GGGGGGGGGGGGGGGGGGGG	配列番号134
GGGGTCAACGTTGAGGGGGG	配列番号135
GGGGTCGACGTCGAGGGGGG	配列番号136
TCCATCGGGGGCCTGATGCT	配列番号137
TCCATGAGGGGCCTGATGCT	配列番号138
TCCATGCGGGTGGGGATGCT	配列番号139
TCCATGGGGGTCCTGATGCT	配列番号140
TCCATGGGGTCCCTGATGCT	配列番号141
TCCATGGGGTGCCTGATGCT	配列番号142
TCCATGGGGTTCCTGATGCT	配列番号143
TCCATGTGGGGCCTGATGCT	配列番号144
TCCATGTGGGGCCTGCTGAT	配列番号145
TCCATGTGGGTGGGGATGCT	配列番号146

より一般的に、本発明のISNAは、少なくとも2つの種類のISNA（CpG核酸、トリッチ核酸、およびポリG核酸を含む）の任意の組み合わせを含み得る。このような組み合わせは、キメラ核酸の形態で生じ得、ここで、少なくとも2つの種類のISNAが、単一の核酸分子で表現される。

【0073】

さらに、異なる配列および／または異なる種類のISNAを有する少なくとも2つの個々の核酸分子が一緒に使用され得る。一緒に使用される少なくとも2つ

の個々の核酸分子は、単一の種類のまたは少なくとも2つの種類のISNAを表現し得る。

【0074】

IFN- α を誘導するための好ましい組成物は、ホスホジエステル中心領域を有する分子の3'末端および5'末端において、ホスフェート改変を有するオリゴヌクレオチドを含む組成物である。この好ましい分子は、以下の式：



によって例示され、ここで、Y₁およびY₂は、互いに独立しており、1ヌクレオチドと10ヌクレオチドの間を有する核酸分子であり、そしてここで、Y₁が少なくとも1つの改変されたヌクレオチド間連結を含み、そしてY₂が少なくとも1つの改変されたヌクレオチド間連結を含み、そしてN₁およびN₂が、核酸分子であり、それぞれが互いに独立して0ヌクレオチドと20ヌクレオチドの間を有し、そしていくつかの実施形態において、3ヌクレオチドと8ヌクレオチドの間を有するが、N₁ C G N₂は、合計で少なくとも6ヌクレオチドを有し、そしてN₁ C G N₂のヌクレオチドは、ホスホジエステル骨格を有する。中心領域が1つ以上のホスホジエステルヌクレオチド間連結を有する1つ以上のホスホロチオエート改変ヌクレオチド間連結を有するオリゴヌクレオチドが、IFN- α を誘導する予期されない高い能力を示した。これらのオリゴヌクレオチドの活性は、最初の2つおよび最後の5つのヌクレオチド間連結がホスフェート改変を含み、そして／またはオリゴヌクレオチドがポリG末端を含む場合、特に高かった。

【0075】

Y₁およびY₂は、互いに独立していると考えられる。これは、Y₁およびY₂のそれぞれが、同じ分子内で互いに異なる配列および異なる骨格連結を有しても良いし有していなくても良いことを意味する。配列は、種々であるが、いくつかの場合において、Y₁およびY₂が、ポリG配列を有する。ポリG配列とは、列における少なくとも3つのGをいう。他の実施形態において、ポリG配列とは、列における少なくとも4つ、5つ、6つ、7つ、または8つのGをいう。

【0076】

いくつかの実施形態において、Y₁およびY₂は、3ヌクレオチドと8ヌクレオ

チドの間または4ヌクレオチドと7ヌクレオチドの間を有する。これらのヌクレオチドの少なくとも1つは、改変されたヌクレオチド間連結を含む。いくつかの実施形態において、Y₁およびY₂は、少なくとも2つの改変されたヌクレオチド間連結を含み、そして他の実施形態において、Y₁およびY₂は、2つと5つの間の改変されたヌクレオチド間連結を含む。なお他の実施形態において、Y₁は、2つの改変されたヌクレオチド間連結を有し、そしてY₂は、5つの改変されたヌクレオチド間連結を有する。他の実施形態において、Y₁は、5つの改変されたヌクレオチド間連結を有し、そしてY₂が、2つの改変されたヌクレオチド間連結を有する。

【0077】

I型IFNの分泌を誘導するための、本発明の例示的な好ましいISNAは、以下の表5に示され、小文字がホスホロチオエート連結を示し、そして大文字がホスホジエステル連結を示す。

【0078】

【表5】

表5. I型IFNを誘導するための例示的塩基配列ISNA

ggGGTCAACGTTGAgggggG	ODN 1585	配列番号1
tcgtcgttttcgttttcgtt	ODN 2022	配列番号2
ggggtcgtcgttttgggggg	ODN 2184	配列番号3
tcgtcgttttcgttttgggggg	ODN 2185	配列番号4
ggggtcgacgtcgagggggg	ODN 2192	配列番号5
ggggtcacgtcgagggggg	ODN 2204	配列番号6
ggGGGACGATCGTCggggggG	ODN 2216	配列番号7
gggggtcgtacgacgggggg	ODN 2217	配列番号8
ggGGGACGATATCGTCggggggG	ODN 2245	配列番号9
ggGGGACGACGTCGTCggggggG	ODN 2246	配列番号10
ggGGGACGAGCTCGTCggggggG	ODN 2247	配列番号11
ggGGGACGTACGTCggggggG	ODN 2248	配列番号12
ggGGGACGATCGTTggggggG	ODN 2252	配列番号13
ggGGAACGATCGTCggggggG	ODN 2253	配列番号14
ggGGGGACGATCGTCggggggG	ODN 2254	配列番号15
ggGGGACGATCGTCggggggG	ODN 2255	配列番号16
ggGGGTCATCGATGAgggggG	ODN 2260	配列番号17
ggGGTCGTCGACGAgggggG	ODN 2293	配列番号18
ggGGTCGTTTCGAACGAgggggG	ODN 2294	配列番号19
ggGGACGTTTCGAACGTggggggG	ODN 2295	配列番号20
ggGGAACGACGTCGTTggggggG	ODN 2297	配列番号21
ggGGAACGTACGTCggggggG	ODN 2298	配列番号22
ggGGAACGTACGTACGTTggggggG	ODN 2299	配列番号23
ggGGTCACCGGTGAgggggG	ODN 2300	配列番号24
ggGGTCGACGTCGTCGAgggggG	ODN 2301	配列番号25
ggGGACCGGTACCGGTggggggG	ODN 2302	配列番号26
ggGTCGACGTCGAgggggG	ODN 2303	配列番号27
ggGGTCGACGTCGAggggg	ODN 2304	配列番号28
ggGGAACGTTAACGTTggggggG	ODN 2305	配列番号29
ggGGACGTCGACGTggggggG	ODN 2306	配列番号30
ggGGGTCGTTTCGTTggggggG	ODN 2311	配列番号31
ggGACGATCGTCGggggggG	ODN 2328	配列番号32
ggGTCGTCGACGAgggggggG	ODN 2329	配列番号33
ggTCGTCGACGAGggggggG	ODN 2330	配列番号34
ggGGACGATCGTCGggggggG	ODN 2332	配列番号35
ggGGTCGACGTCGACGTCGAGggggggG	ODN 2334	配列番号36, および
ggGGACGACGTCGTCGggggggG	ODN 2336	配列番号37

本発明における使用のために、核酸は、当該分野において周知の任意の多くの手順を使用して、新たに合成され得る。例えば、核酸は、 β -シアノエチルホスホラミダイト法 (Beaucage SLおよびCaruthers MH Tetrahedron Lett 22:1859 (1981)) またはヌクレオシド H-ホスホネート法 (Gareggら、Tetrahedron Lett 27:4051 (1986); Froehlerら、Nucl Acid Res 14:5399 (1986); Gareggら、Tetrahedron Lett 27:4055 (1986); Gaffneyら、Tetrahedron Lett 29:2619 (1988)) を使用して合成され得

る。これらの化学は、市場で入手可能な種々の自動化オリゴヌクレオチド合成機によって実行され得る。これらのオリゴヌクレオチドは、合成ヌクレオチドと呼ばれる。あるいは、ISNAは、プラスミド中で大量に作製され得（Sambrook、T. ら、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、Cold Spring Harbor Laboratory Press、New York、1989を参照のこと）、そしてより小さな片に分離され得るかまたは全体として投与され得る。オリゴヌクレオチドは、公知技術（例えば、制限酵素、エキソヌクレアーゼまたはエンドヌクレアーゼを使用する技術）を使用して、既存の核酸配列（例えば、ゲノムDNAまたはcDNA）から調製され得る。この方法で調製されるオリゴヌクレオチドは、単離されたオリゴヌクレオチドと呼ばれる。用語ISNAは、合成された免疫刺激性核酸と単離された免疫刺激性核酸との両方を包含する。

【0079】

インビボでの使用のために、ISNAは、好ましくは、分解に対して比較的耐性である（例えば、安定化される）。「安定化された核酸分子」は、インビボ分解（例えば、エキソヌクレアーゼまたはエンドヌクレアーゼによる）に対して比較的耐性である核酸分子を意味する。安定化は、長さまたは2次構造の関数であり得る。例えば、数十～数百kbの長さであるISNAは、インビボ分解に対して比較的耐性である。より短いISNAについて、二次構造は、安定化され得そしてそれらの効果を増加し得る。例えば、オリゴヌクレオチドの3'末端が上流領域に対して自己相補性を有し、その結果、折り畳まれそして一種のステムループ構造を形成し得る場合、オリゴヌクレオチドは、安定化され、従ってより活性を示す。

【0080】

あるいは、核酸安定化は、ホスフェート骨格改変を介して達成され得る。本発明の好ましい安定化されたオリゴヌクレオチドは、改変された骨格を有する。オリゴヌクレオチド骨格の改変が、インビボで投与される場合、ISNAの活性の増加を提供することが示されている。これらの安定化された構造は、本発明のISNAが少なくとも部分的に改変された骨格を有するので、好ましい。例えば、

オリゴヌクレオチドの5'末端に少なくとも2つのホスホロチオエート連結および3'末端に複数のホスホロチオエート連結（好ましくは、5つ）を含む所与の配列のCpGオリゴヌクレオチドは、最大の活性を提供し、そして細胞内エキソヌクレアーゼおよびエンドヌクレアーゼによる分解からオリゴヌクレオチドを保護する。他の改変オリゴヌクレオチドには、ホスホジエステル改変オリゴヌクレオチド、ホスホジエステルおよびホスホロチオエートオリゴヌクレオチドの組み合わせ、メチルホスホネート、メチルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ならびにこれらの組み合わせが挙げられる。これらの組み合わせのそれぞれおよび免疫細胞に対するそれらの特定の効果は、PCT公開特許出願PCT/US95/01570およびPCT/US97/19791（1995年2月7日および1997年10月30日にそれぞれ出願された米国シリアル番号08/386,063号および同08/960,774号について優先権を主張する）にさらに詳細に議論され、この全体の内容が、本明細書によって参考として援用される。これらの改変された骨格オリゴヌクレオチドが、増強されたヌクレアーゼ耐性、増加した細胞取り込み、増加したタンパク質結合、および／または改変された細胞内局在化に起因して、より刺激性の活性を示し得ると考えられる。

【0081】

ホスホロチオエートのような改変された骨格を、ホスホルアミデートまたはH-ホスホネートのいずれかの化学を用いて、自動化技術を使用して合成し得る。アリールホスホネートおよびアルキルホスホネートを、例えば、米国特許第4,469,863号に記載されるように作製し得る；そしてアルキルホスホトリエステル（ここで、荷電した酸素部分は、米国特許第5,023,243号および欧州特許第092,574号に記載されるようにアルキル化される）を、市販の試薬を使用して、自動化固相合成によって調製し得る。DNA骨格の他の改変および置換を行うための方法が、記載されている。Uhlmann EおよびPeymann A Chem Rev 90:544（1990）；Goodchild J Bioconjugate Chem 1:165（1990）。

【0082】

他の安定化オリゴヌクレオチドとしては、以下が挙げられる：非イオン性DN

Aアナログ（例えば、アルキルホスフェートおよびアリールホスフェート（ここで、荷電したホスホネート酸素が、アルキル基またはアリール基によって置換されている）ならびにアルキルホスホジエステルおよびアルキルホスホトリエステル（ここで、荷電した酸素部分がアルキル化されている））。いずれかまたは両方の末端においてジオールを含むオリゴヌクレオチド（例えば、テトラエチレングリコールまたはヘキサエチレングリコール）もまた、ヌクレアーゼ分解に対して実質的に抵抗性であることが示された。

【0083】

いくつかの実施形態において、本発明によって有用なISNAは、SおよびRのキラルなISNAである。「SキラルISNA」とは、本明細書中において使用される場合に、少なくとも2つのヌクレオチドがキラル中心を形成する骨格改変を有し、そしてこれらの複数のキラル中心がSキラリティーを有する、ISNAである。「RキラルISNA」とは、本明細書中において使用される場合に、少なくとも2つのヌクレオチドがキラル中心を形成する骨格改変を有し、そしてこれらの複数のキラル中心がRキラリティーを有する、ISNAである。骨格改変は、キラル中心を形成する任意の型の改変であり得る。この改変としては、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、メチルホスホネート、メチルホスホロチオエート、およびこれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

【0084】

キラルISNAは、骨格改変を有する少なくとも2つのヌクレオチドを、オリゴヌクレオチド内に有さなければならない。しかし、このオリゴヌクレオチド内の全てまたは一部のヌクレオチドが、改変された骨格を有し得る。改変された骨格を有するヌクレオチド（キラル中心と呼ぶ）のうちの複数のものが、単一のキラリティー（SまたはR）を有する。「複数」とは、本明細書中において使用される場合に、50%より多い量をいう。従って、一部のキラル中心は、複数のキラル中心がSまたはRのキラリティーを有する限り、SまたはRのキラリティーを有し得る。いくつかの実施形態において、少なくとも55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%のキラル

中心が、SまたはRのキラリティーを有する。他の実施形態において、少なくとも55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または100%のヌクレオチドが、骨格改変を有する。

【0085】

SおよびRのキラルISNAは、キラル的に純粋なオリゴヌクレオチドを生成するための、当該分野において公知の任意の方法によって、調製され得る。立体的に純粋なホスホロチオエートオリゴデオキシヌクレオチドを、オキサチアホスホラン法を使用して生成するための方法を教示する、多くの参考文献が、刊行されている。Stec WJら、J Am Chem Soc 117:12019 (1995)。キラル的に純粋なオリゴヌクレオチドを作製するための他の方法は、ISIS Pharmaceuticalsのような会社によって、記載されている。米国特許もまた、これらの方法を記載している。例えば、米国特許第5,883,237号；同第5,837,856号；同第5,599,797号；同第5,512,668号；同第5,856,465号；同第5,359,052号；同第5,506,212号；同第5,521,302号；および同第5,212,295号（これらの各々は、その全体が本明細書中に参考として援用される）は、立体的に純粋なオリゴヌクレオチドを生成するための方法を開示する。

【0086】

「被験体」とは、ヒトまたは脊椎動物を意味するべきであり、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ、非ヒト霊長類（例えば、サル）、魚類（水産養殖種、例えば、サケ）、ウサギ、ラット、およびマウスが挙げられるが、これらに限定されない。

【0087】

「増殖性障害を有する被験体」とは、検出可能な所望でない増殖性細胞を有する被験体である。所望でない増殖性細胞は、癌を有する被験体における癌細胞であり得る。癌は、悪性の癌であっても非悪性の癌であってもよい。癌または腫瘍としては、胆管癌；膀胱癌；脳癌；乳癌；頸部癌；絨毛癌；結腸癌；子宮内膜癌；食道癌；胃癌（gastric cancer）；上皮内新生物；白血病；肝

癌；肺癌（例えば、小細胞および非小細胞）；リンパ腫；黒色腫；多発性骨髄腫；神経芽細胞腫；口腔癌；卵巣癌；膵臓癌；前立腺癌；直腸癌；腎癌；肉腫；皮膚癌；胃癌（stomach cancer）；精巣癌；および甲状腺癌；ならびに他の癌腫および肉腫が挙げられるが、これらに限定されない。他の実施形態において、所望でない増殖性細胞は、非癌性であり得る（例えば、自己免疫状態または炎症性状態に関連する細胞）。

【0088】

「ウイルス感染を有する被験体」とは、ウイルスに曝露され、そして急性または慢性の症状発現または検出可能なレベルのウイルスを身体内に有する、被験体である。

【0089】

ヒトにおいて見出されたウイルスの例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：Retroviridae（例えば、ヒト免疫不全ウイルス（例えば、HIV-1（HTLV-III、LAVもしくはHTLV-III/LAV、またはHIV-IIIともまた呼ばれる）；および他の単離体（例えば、HIV-LP））；Picornaviridae（例えば、ポリオウイルス、A型肝炎ウイルス）；エンテロウイルス属、ヒトコクサッキーウイルス、ライノウイルス、ECHOウイルス）；Calciviridae（例えば、胃腸炎を引き起こす株）；Togaviridae（例えば、ウマ脳炎ウイルス、風疹ウイルス）；Flaviridae（例えば、C型肝炎ウイルス（HCV）、デング熱ウイルス、脳炎ウイルス、黄熱病ウイルス）；Coronaviridae（例えば、コロナウイルス）；Rhabdoviridae（例えば、水疱性口内炎ウイルス、狂犬病ウイルス）；Filoviridae（例えば、エボラウイルス）；Paramyxoviridae（例えば、パラインフルエンザウイルス、流行性耳下腺炎ウイルス、麻疹ウイルス、RSウイルス）；Orthomyxoviridae（例えば、インフルエンザウイルス）；Bungaviridae（例えば、ハンタウイルス、ブンヤウイルス（bungavirus）、プレボウイルスおよびナイロウイルス（Nairovirus））；アレナウイルス科（出血熱ウイルス）；Reoviridae（例えば、レオウ

イルス、オルビウイルスおよびロタウイルス) ; Birnaviridae ; Hepadnaviridae (B型肝炎ウイルス) ; Parvoviridae (パルボウイルス) ; Papovaviridae (パピローマウイルス、ポリオーマウイルス) ; Adenoviridae (大部分のアデノウイルス) ; Herpesviridae (単純ヘルペスウイルス (HSV) 1および2、水痘-帯状疱疹ウイルス、サイトメガロウイルス (CMV)、ヘルペスウイルス) ; Poxviridae (痘瘡ウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス) ; Iridoviridae (例えば、アフリカ豚コレラウイルス) ; ならびに分類されていないウイルス (例えば、海綿状脳障害の病因学的因子、デルタ型肝炎の因子 (B型肝炎ウイルスの欠損サテライトであると考えられる)、非A非B肝炎の分類されていない因子 (クラス1=内部に透過した ; クラス2=非経口的に透過した) ; ノーウォークウイルスおよび関連ウイルス、およびアストロウイルス)。

【0090】

上記ウイルスの多くはヒトの障害に関連するが、本発明はまた、非ヒト脊椎動物の処置にも有用である。非ヒト脊椎動物はまた、本明細書中に開示される ISNA で予防または処置され得る感染を発生させ得る。例えば、感染性のヒトの疾患の処置に加えて、本発明の方法は、動物の感染を処置するために有用である。

【0091】

ヒトと非ヒト脊椎動物との両方の感染性ウイルスとしては、レトロウイルス、RNAウイルスおよびDNAウイルスが挙げられる。レトロウイルスのこの群は、単純レトロウイルスと複雑レトロウイルスとの両方を含む。単純レトロウイルスは、B型レトロウイルス、C型レトロウイルス、およびD型レトロウイルスのサブグループを含む。B型レトロウイルスの例は、マウス乳腺癌ウイルス (MMTV) である。C型レトロウイルスとしては、C型A群 (ラウス肉腫ウイルス (RSV)、鳥類白血病ウイルス (ALV) および鳥類骨髓芽球症ウイルス (AMV) を含む) およびC型B群 (マウス白血病ウイルス (MLV)、ネコ白血病ウイルス (FeLV)、マウス肉腫ウイルス (MSV)、テナガザル白血病ウイルス (GALV)、脾臓壊死ウイルス (SNV)、細網内皮症ウイルス (RV) お

よびサル肉腫ウイルス（SSV）を含む）が挙げられる。D型レトロウイルスとしては、マソン－ファイザーサルウイルス（MPMV）およびサルレトロウイルス1型（SRV-1）が挙げられる。複雑レトロウイルスとしては、レンチウイルス、T細胞白血病ウイルスおよび泡沫状ウイルスのサブグループが挙げられる。レンチウイルスとしては、HIV-1が挙げられるが、HIV-2、SIV、ビスナウイルス、ネコ免疫不全ウイルス（FLV）、およびウマ伝染性貧血ウイルス（EIAV）もまた挙げられる。T細胞白血病ウイルスとしては、HTLV-1、HTLV-2、サルT細胞白血病ウイルス（STLV）、およびウシ白血病ウイルス（BLV）が挙げられる。泡沫状ウイルスとしては、ヒト泡沫状ウイルス（HFV）、サル泡沫状ウイルス（SFV）およびウシ泡沫状ウイルス（BFV）が挙げられる。

【0092】

脊椎動物において抗原である他のRNAウイルスの例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：オルソレオウイルス属（哺乳動物とニワトリの両方のレトロウイルスの複数の血清型）、オルビウイルス属（ブルータングウイルス、ユーベナンギー（Eugeneage）ウイルス、ケメロボウイルス、アフリカウマ疫ウイルス、およびコロラドダニ熱ウイルス）、ロタウイルス属（ヒトロタウイルス、ネブラスカ仔ウシ症下痢ウイルス、マウスロタウイルス、サルロタウイルス、ウシまたはヒツジロタウイルス、ニワトリロタウイルス）を含むレオウイルス科のメンバー；エンテロウイルス属（ポリオウイルス、コクサッキーウイルスのA群およびB群、腸細胞変性ヒトオーファン（enteric cytopathic human orphan）（ECHO）ウイルス、A型肝炎ウイルス、シミアンエンテロウイルス、マウス脳脊髄炎（ME）ウイルス、ポリオウイルスムリス（muris）、ウシエンテロウイルス、ブタエンテロウイルス、カルジオウイルス属（脳心筋炎ウイルス（EMC）、メンゴウイルス）、ライノウイルス属（少なくとも113のサブタイプを含むヒトライノウイルス；他のライノウイルス）、アプトウイルス（Aptovirus）属（口蹄疫ウイルス（FMDV））を含むピコルナウイルス科；ブタ水疱性ウイルス、サン・ミエルアシカウイルス、ネコピコルナウイルスおよびノーウォークウイル

スを含むカルシウイルス科；アルファウイルス属（東部ウマ脳炎ウイルス、セムリキ森林ウイルス、シンドビスウイルス、チクングンヤウイルス、オニオニオンウイルス、ロスリバーウイルス、ベネズエラウマ脳炎ウイルス、西部ウマ脳炎ウイルス）、フラビウイルス（*Flavivirus*）属（モスキート媒介性黄熱病ウイルス、デングウイルス、日本脳炎ウイルス、セントルイス脳炎ウイルス、マリーヌ溪谷脳炎ウイルス、西ナイルウイルス、クンジンウイルス、中央ヨーロッパダニ媒介性ウイルス、極東ダニ媒介性ウイルス、キャサヌール森林病ウイルス、跳躍病（*Louping ILL*）ウイルス、ポワサンウイルス、オムスク出血熱ウイルス）、ルビウイルス属（風疹ウイルス）、ペスチウイルス属（粘膜病ウイルス、豚コレラウイルス、国境病ウイルス）を含むトガウイルス科；ブニヤウイルス属（ブニャンベラウイルスおよび関連ウイルス、カリフォルニア脳炎群ウイルス）、フレボウイルス属（サシチョウバエ熱シシリイ型（*Sicilian*）ウイルス、リフトバレー熱ウイルス）、ナイロウイルス属（クリミアーコンゴ出血性熱ウイルス、ナイロビヒツジ病ウイルス）、およびウウクウイルス属（ウウクニエミーウイルスおよび関連ウイルス）を含むブニヤウイルス科；インフルエンザウイルス属（A型インフルエンザウイルス、多くのヒトサブタイプ）；ブタインフルエンザウイルス、ならびにニワトリおよびウマのインフルエンザウイルス；B型インフルエンザ（多くのヒトサブタイプ）、そしてC型インフルエンザ（おそらく異なる属）を含むオルトミクソウイルス科；パラミクソウイルス属（I型パラインフルエンザウイルス、センダイウイルス、血球吸着ウイルス、2型～5型のパラインフルエンザウイルス、ニューカッスル病ウイルス、ムンプスウイルス）、モルビリウイルス属（麻疹ウイルス、亜急性硬化性汎脳炎ウイルス、ジステンパーウイルス、牛痘ウイルス）、ニューモウイルス属（RSウイルス（RSV）、ウシRSウイルスおよびマウス肺炎ウイルス）を含むパラミクソウイルス科；森林ウイルス、シンドビスウイルス、チクングンヤウイルス、オニオニオンウイルス、ロスリバーウイルス、ベネズエラウマ脳炎ウイルス、西部ウマ脳炎ウイルス）、フラビウイルス（*Flavivirus*）属（モスキート媒介性黄熱病ウイルス、デングウイルス、日本脳炎ウイルス、セントルイス脳炎ウイルス、マリーヌ溪谷脳炎ウイルス、西ナイルウイルス、クンジンウイルス、中央ヨーロ

ッパダニ媒介性ウイルス、極東ダニ媒介性ウイルス、キャサヌール森林病ウイルス、跳躍病 (Louping I I I) ウイルス、ポワサンウイルス、オムスク出血熱ウイルス)、ルビウイルス属 (風疹ウイルス)、ペスチウイルス属 (粘膜病ウイルス、豚コレラウイルス、国境病ウイルス) ; ブニヤウイルス属 (ブニヤンペラウイルスおよび関連ウイルス、カリフォルニア脳炎群ウイルス)、フレボウイルス属 (サシチョウバエ熱シシリ型 (S i c i l i a n) ウイルス、リフトバレー熱ウイルス)、ナイロウイルス属 (クリミア-コンゴ出血性熱ウイルス、ナイロビヒツジ病ウイルス)、およびウウクウイルス属 (ウウクニエミーウイルスおよび関連ウイルス) を含むブニヤウイルス科; インフルエンザウイルス属 (A型インフルエンザウイルス、多くのヒトサブタイプ) ; プタインフルエンザウイルス、ならびにニワトリおよびウマのインフルエンザウイルス; B型インフルエンザ (多くのヒトサブタイプ)、そしてC型インフルエンザ (おそらく異なる属) を含むオルトミクソウイルス科; パラミクソウイルス属 (I型パラインフルエンザウイルス、センダイウイルス、血球吸着ウイルス、2型~5型のパラインフルエンザウイルス、ニューカッスル病ウイルス、ムンプスウイルス)、モルビリウイルス属 (麻疹ウイルス、亜急性硬化性汎脳炎ウイルス、ジステンパーウイルス、牛痘ウイルス)、ニューモウイルス属 (RSウイルス (RSV)、ウシRSウイルスおよびマウス肺炎ウイルス) を含むパラミクソウイルス科; ベジキユロウイルス属 (VSV) (チャンディプラウイルス、フランダース-ハートパークウイルス)、リサウイルス属 (狂犬病ウイルス)、魚類ラブドウイルスならびに2つの推定ラブドウイルス (マールブルクウイルスおよびエボラウイルス) を含むラブドウイルス科; リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCM)、タカリベウイルス複合体、およびラッサウイルスを含むアレナウイルス科; 伝染性気管支炎ウイルス (IBV)、マウス肝炎ウイルス、ヒト腸コロナ (Human enteric corona) ウイルス、およびネコの伝染性腹膜炎 (ネコのコロナウイルス) を含むコロナウイルス (Coronoaviridae) 科。

【0093】

脊椎動物において抗原である例示のDNAウイルスは、制限されないで: オルトボックスウイルス属 (大疱瘡ウイルス、小疱瘡ウイルス、サルボックスワクシ

ニア、ウシボックス、バッファローボックス、ウサギボックス、エクトロメリア)、ウサギボックスウイルス属(粘液腫ウイルス、線維腫ウイルス)、トリボックスウイルス属(ニワトリボックスウイルス、その他のトリボックスウイルス)、ヤギボックスウイルス属(ヒツジボックス、ヤギボックス)、スイボックス属(ブタボックス)、パラボックスウイルス属(伝染性膿瘡性皮膚炎ウイルス、偽ウシボックス、ウシ丘疹性口内炎ウイルス)を含む、ボックスウイルス科;イリドウイルス科(アフリカブタコレラウイルス、カエルウイルス2および3、魚のリンパ囊腫ウイルス); α ヘルペスウイルス(1型および2型単純ヘルペス、水痘-帯状ヘルペス、ウマ流産ウイルス、2型および3型ウマヘルペスウイルス、仮性狂犬病ウイルス、ウシ伝染性角結膜炎ウイルス、ウシ伝染性鼻気管炎ウイルス、ネコ鼻気管炎ウイルス、伝染性咽頭気管炎ウイルス) β ヘルペスウイルス(ヒトサイトメガロウイルス、ならびにブタ、サルおよびげっ歯類のサイトメガロウイルス); γ ヘルペスウイルス(エプスタイン-バーウイルス(EBV)、マレク病ウイルス、リスザルヘルペスウイルス、クモザルヘルペスウイルス、ノウサギヘルペスウイルス、モルモットヘルペスウイルス、リュッケ腫瘍ウイルス)を含むヘルペスウイルス科;マストアデノウイルス属(ヒトA、B、C、DE亜群および非群(ungrouped));サルアデノウイルス(少なくとも23の血清型)、イヌ伝染性肝炎、ならびにウシ、ブタ、ヒツジ、カエルその他の多くの種のアデノウイルス、トリアデノウイルス属(トリアデノウイルス類):および培養可能でないアデノウイルス類を含むアデノウイルス科;パピローマウイルス属(ヒトパピローマウイルス、ウシパピローマウイルス、ショープウサギパピローマウイルス、およびその他の種の種々の病原性パピローマウイルス)、ポリオーマウイルス属(ポリオーマウイルス、サル空胞形成因子(SV-40)、ウサギ空胞形成因子(RKV)、Kウイルス、BKウイルス、JCウイルス、およびリンパ増殖性パピローマウイルスのようなその他の霊長類ポリオーマウイルス)を含むパピローマウイルス科;アデノ随伴ウイルス属、パルボウイルス属(ネコ汎白血球減少症ウイルス、ウシパルボウイルス、イヌカルボウイルス、アリュシャンミンク病ウイルスなど)を含むパルボウイルス科を含む。最後に、DNAウイルスは、クルーおよびクロイツフェルト-ヤーコブ病ウイルスおよび慢

性伝染性神経障害因子（CHINAウイルス）のような上記の科に適合しないウイルスを含み得る。

【0094】

先行するリストの各々は例示であり、そして制限されることを意図しない。さらに、インタクトな形態またはそのフラグメントとしてのいずれかであるこれらのウイルスが、免疫化手順における抗原として用いられ得る。抗原は、免疫系によって異物として認識される物質であり、そしてこれは、特異的免疫を誘導する。抗原は、炭水化物（例えば、多糖類、糖脂質、および糖タンパク質を含む）、タンパク質およびポリペプチド、ならびにその他のオリゴマー、ポリマー、および免疫細胞上の抗原レセプターに結合し得る小分子であり得る。抗原に対する特異的免疫は、T細胞および／またはB細胞による抗原認識を含み得る。

【0095】

適切なISNAを含む核酸は、任意の脊椎動物で有効であり得る。ISNAを含む異なる核酸は、哺乳動物種に依存して最適な免疫刺激を引き起こし得る。それ故、ヒトにおいて最適刺激または阻害を引き起こすオリゴヌクレオチドは、マウスにおける最適刺激または阻害を引き起こさないかもしれないし、そのまた逆も同様である。当業者は、本明細書で提供される指針を用い、本明細書に記載および／または当該分野で公知の慣用的なアッセイを用いて目的の特定の哺乳動物種に対して有効な最適オリゴヌクレオチドを同定し得る。

【0096】

このISNAは、被験体に直接投与され得るか、または核酸送達複合体とともに投与され得る。「核酸送達複合体」は、標的化手段（例えば、標的細胞（例えばB細胞表面）に対してより高い親和性結合を生じるか、および／または標的細胞による増加した細胞取り込みを生じる分子）と会合した（イオンのまたは共有結合により；またはその中にカプセル化される）核酸分子を意味する。核酸送達複合体の例は：ステロール（例えばコレステロール）、脂質（例えばカチオン性脂質、ビロソームまたはリポソーム）、または標的細胞特異的結合剤（例えば標的細胞の特異的レセプターにより認識されるリガンド）と会合した核酸を含む。好適な複合体は、標的細胞によるインターナリゼーションの前の有意な非カップ

リングを防ぐに十分、インピボで安定であり得る。しかし、この複合体は、細胞内の適切な条件下で切断可能であり得、その結果この核酸は機能的形態で放出される。

【0097】

このISNAまたはその他の治療剤は、単独で投与され得るか（例えば、生理食塩水または緩衝液）、または当該分野で公知の任意の送達ビヒクルを用いて投与され得る。例えば、以下の送達ビヒクルが報告されている：蝸牛殻（cochleate）（Gould-Fogeriteら、1994、1996）；エマルソーム（Vancottら、1998、Lowellら、1997）；ISCOM（Mowatら、1993、Carlssonら、1991、Huら、1998、Moreinら、1999）；リポソーム（Childersら、1999、Michalekら、1989、1992、de Haan 1995a、1995b）；生存細菌ベクター（例えば、Salmonella、Escherichia coli、Bacillus Calmette-Guerin、Shigella、Lactobacillus）（Honeら、1996、Pouwelsら、1998、Chatfieldら、1993、Stoverら、1991、Nugentら、1998）；生存ウイルスベクター（例えば、ワクシニア、アデノウイルス、単純ヘルペス）（Gallichanら、1993、1995、Mossら、1996、Nugentら、1998、Flexnerら、1988、Morrowら、1999）；マイクロスフェア（Guptaら、1998、Jonesら、1996、Maloyら、1994、Mooreら、1995、O'Haganら、1994、Eldridgeら、1989）；核酸ワクチン（Fynanら、1993、Kuklinら、1997、Sasakiら、1998、Okadaら、1997、Ishiiら、1997）；ポリマー（例えば、カルボキシメチルセルロース、キトサン）（Hamajimaら、1998、Jabbal-Gillら、1998）；ポリマーリング（Wyattら、1998）；プロテオソーム（Vancottら、1998、Lowellら、1988、1996、1997）；フッ化ナトリウム（Hashiら、1998）；トランスジェニック植物（Tacketら、1998、Maso

nら、1998、Haqら、1995) ; ピロソーム (Gluckら、1992、Mengiardiら、1995、Cryzら、1998) ; ウイルス様粒子 (Jiangら、1999、Leiblら、1998)。当業者は、当該分野で公知であるその他の送達ビヒクルもまた用いられ得ることを認識する。

【0098】

本明細書で提供される教示と組み合わせ、種々の活性化化合物の中から選択すること、および効力、相対的な生体利用性、患者体重、副作用の重篤度および投与の好適な様式のような因子を重み付けすることによって、実質的な毒性を引き起こさず、そしてなお特定の患者を処置するために完全に有効である有効な予防または治療処置養生法が計画され得る。任意の特定の適用のために有効な量は、処置される疾患または症状、投与される特定のISNA（例えば、非メチル化CpGモチーフの数もしくは核酸中のそれらの位置、オリゴヌクレオチドに対するキラリティーの程度）、抗原、被験体のサイズ、または疾患または症状の重篤度のような因子に依存して変化し得る。当業者は、特定のISNAおよび／または抗原および／またはその他の治療薬剤の有効量を、過度の実験を必要とすることなく経験的に決定し得る。

【0099】

成人ヒト被験体には、本明細書に記載されるISNA化合物の用量は、代表的には、約50 μ g / 用量～20mg / 用量、より代表的には約80 μ g / 用量～8mg / 用量、そして最も代表的には約800 μ g / 用量～4mg / 用量の範囲である。被験体体重に関して記述すれば、代表的な投与量は、約0.5～500 μ g / kg / 用量、より代表的には約1～100 μ g / kg / 用量、そして最も代表的には、約10～50 μ g / kg / 用量の範囲である。用量は、投与の経路を含む因子に依存し得、例えば、経口投与は、皮下投与より実質的に大きな用量を必要とし得る。

【0100】

本発明の処方物は、薬学的に受容可能な溶液中で投与され、これは、慣用的に、薬学的に受容可能な濃度の塩、緩衝化剤、保存剤、適合キャリア、アジュバント、および必要に応じてその他の治療成分を含み得る。

【0101】

このISNAは、IFN α と組み合わせると有用であることが当該分野で公知であるその他の薬剤と組み合わせて与えられ、ウイルスおよび増殖性障害を処置し得る。IFN α と組み合わせて現在使用されているか、または使用のために調査中であるこのような他の薬剤の例は、リバビリン、アマンタジン、化学的治療剤（例えば、5-フルオロウラシルおよびBCNU）、放射線照射治療、光治療、ならびにIL-2、IL-12、およびIFN- γ を含むサイトカインを含む。

【0102】

治療における使用には、このISNAの有効量は、所望の部位、例えば、粘膜、全身に、このISNAを送達する任意の様式によって被験体に投与され得る。本発明の薬学的組成物を「投与すること」は、当業者に公知の任意の手段により達成され得る。好適な投与の経路は、制限されないで、経口、非経口、損傷内、局所的、経皮、筋肉内、鼻内、気管内、吸入、眼、膣、および直腸を含む。

【0103】

経口投与には、化合物（すなわち、ISNA、抗原、その他の治療剤）は、これら化合物（単数または複数）を、当該分野で周知の薬学的に受容可能なキャリアと組み合わせることにより容易に処方され得る。このようなキャリアは、本発明の化合物を、処置される被験体による経口摂取のために、錠剤、ピル、糖衣丸、カプセル、液体、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁液などとして処方されることを可能にする。経口使用のための薬学的調製物は、固形の賦形剤として得られ得、必要に応じて、得られる混合物を砕き、そして所望であれば、適切な補助剤を添加した後に顆粒の混合物を処理する。適切な賦形剤は、詳細には糖などの充填剤であり、これには、ラクトース、スクロース、マンニトール、またはソルビトール；例えば、トウモロコシスターチ、小麦スターチ、コメスターチ、ポテトスターチ、ゼラチン、ガムトラガンタ、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、および／またはポリビニルピロリドン（PVP）が含まれる。所望であれば、架橋ポリビニルピロリドン、寒天、またはアルギン酸もしくはアルギン酸ナトリウムのようなその塩

などの崩壊剤が添加され得る。必要に応じて、この経口処方物はまた、内部の酸性条件を中和するために、生理食塩水または緩衝液中に処方され得るか、または任意のキャリアなくして投与され得る。

【0104】

糖衣丸コアは、適切なコーティングとともに提供される。この目的には、濃縮された糖溶液が用いられ得、これは、必要に応じて、アラビアガム、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボポルゲル、ポリエチレングリセロール、および／または二酸化チタン、ラッカー溶液、および適切な有機溶媒または溶媒混合物が含まれ得る。染料材料または色素が、異なる組み合わせの活性化合物用量を識別または特徴付けるために錠剤または糖衣丸コーティングに添加され得る。

【0105】

経口的に用いられ得る薬学的調製物は、ゼラチンから作られるプッシュフィットカプセル、およびゼラチンとグリセロールまたはソルビトールのような可塑剤とから作られるソフトシールカプセルを含む。このプッシュフィットカプセルは、ラクトースのような充填剤、スターチのような結合剤、および／またはタルクもしくはステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ならびに必要に応じて安定剤との混合物中に活性成分を含み得る。ソフトカプセルでは、活性化合物は、脂肪油、液体パラフィン、または液体ポリエチレングリコールのような適切な液体中に溶解もしくは懸濁され得る。さらに、安定剤が添加され得る。経口投与のために処方されたマイクロスフェアもまた用いられ得る。このようなマイクロスフェアは、当該分野で良く規定されている。経口投与のためのすべての処方物は、このような投与のために適切な用量であるべきである。

【0106】

口腔投与には、組成物は、従来様式で処方される錠剤またはロゼンジの形態をとり得る。

【0107】

吸入による投与について、本発明に従う使用のための化合物は、適切な推進薬（例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、炭酸ガスまたは他の適切な気体）の使用を伴う圧縮された

容器またはネブライザからのエアロゾルスプレー提示 (presentation) の形態で都合よく送達され得る。圧縮されたエアロゾルの場合、用量単位は、決められた (metered) 量を送達するための弁を提供することによって決定され得る。例えば、吸入器または注入器における使用のためのゼラチンのカプセルおよびカートリッジは、化合物および適切な粉末ベース (例えば、乳酸または澱粉) の粉末混合物を含んで処方され得る。

【0108】

化合物は、全身性に投与されることが所望される場合、非経口的投与 (例えば、ボラス注射または連続注入) による注射について処方され得る。注入のための処方物は、単位用量形態 (例えば、添加された防腐剤を含むアンプル中または複数の投薬容器 (multi-dose container) 中) において示され得る。組成物は、油性または水性のビヒクル中の懸濁液、溶液、または乳濁液のような形態をとり得、そして懸濁剤、安定化剤および／または分散剤のような処方薬を含み得る。

【0109】

非経口投与のための薬学的処方物は、水溶性形態での活性化合物の水性溶液を含む。さらに、活性化合物の懸濁液は、適切な油性注入懸濁液として調製され得る。適切な脂肪親和性溶媒またはビヒクルは、脂肪性の油 (例えば、ゴマ油) または合成脂肪酸エステル (例えば、オレイン酸エチルもしくはトリグリセリド)、あるいはリポソームを含む。水性注入懸濁液は、懸濁液の粘着性を増加する物質 (例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、またはデキストラン) を含み得る。任意には、懸濁液はまた、適切な安定剤または化合物の安定性を増加して高度に濃縮された溶液の調製物を可能にする薬剤を含み得る。

【0110】

あるいは、活性な化合物は、使用前に適切なビヒクル (例えば、滅菌した、発熱物質のない水) との構成のための粉末形態にあり得る。

【0111】

化合物はまた、直腸用組成物または腔用組成物 (例えば、坐剤または貯留浣腸

(例えば、ココアバターもしくは他のグリセリドのような慣用的な坐剤ベースを含む))で処方され得る。

【0112】

以前に記載される処方物に加えて、化合物はまた、貯留調製物として処方され得る。このように長く作用する処方物は、適切な重合体物質または疎水性物質(例えば、受容可能な油中の乳濁液として)またはイオン交換レジンと処方され得るか、あるいは、緩やかに溶解し得る誘導体として(例えば、緩やかに溶解し得る塩として)処方され得る。

【0113】

薬学的組成物はまた、適切な固体またはゲル相キャリアまたは賦形剤を含み得る。このようなキャリアまたは賦形剤の例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない:炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、種々の糖、澱粉、セルロース誘導体、ゼラチン、およびポリエチレングリコールのようなポリマー。

【0114】

適切な液体または固体の薬学的調製物形態は、例えば、吸入のための水溶液または生理食塩水であるか、微小カプセル化されたか、蝸牛殻状にされた(encochleated)か、微細な金粒子状に被膜されたか、リポソームに含まれたか、霧状にされた、エアロゾル、皮膚中への移植のためのペレット、または皮膚を引っ掻くべき鋭利な物上に乾燥された。薬学的組成物としてはまた、以下が挙げられる:顆粒、粉末、錠剤、被膜された錠剤、(微小)カプセル、坐剤、シロップ、乳濁液、懸濁液、クリーム、ドロップまたは遅延された放出を伴う活性な化合物を伴う調製物。これらの調製物において、賦形剤および添加剤および/または補助剤(例えば、崩壊剤、結合剤、被膜剤、膨張剤、滑剤、調味料(flavoring)、甘味料または可溶剤(solubilizer))は、上記のように習慣的に使用される。薬学的組成物は、種々の薬物送達系における使用に適切である。薬物送達のための方法の簡単な総説については、Langer Science 249:1527(1990)(本明細書中に参考として援用される)を参照のこと。

【0115】

ISNAは、それ自体（生で）かまたは薬学的に受容可能な塩の形態で投与され得る。薬において使用される場合、塩は、薬学的に受容可能であるべきであるが、薬学的に受容可能でない塩は、その薬学的受容可能な塩を調製するために慣用的に使用され得る。このような塩としては、以下の酸から調製される塩を含むがこれらに限定されない：塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸、マレイン酸、酢酸、サリチル酸、p-トルエンスルホン酸、酒石酸、クエン酸、メタンスルホン酸、蟻酸、マロン酸、琥珀酸、ナフタレン-2-スルホン酸およびベンゼンスルホン酸。このような塩はまた、アルカリ金属またはアルカリ土類金属の塩（例えば、カルボン酸基のナトリウム塩、カリウム塩またはカルシウム塩）として調製され得る。

【0116】

適切な緩衝化剤としては以下が挙げられる：酢酸および塩（1～2%w/v）；クエン酸および塩（1～3%w/v）；ホウ酸および塩（0.5～2.5%w/v）；ならびにリン酸および塩（0.8～2%w/v）。適切な防腐剤としては、塩化ベンザルコニウム（0.003～0.03%w/v）；クロロブタノール（0.3～0.9%w/v）；パラベン（0.01～0.25%w/v）およびチメロサル（0.004～0.02%w/v）が挙げられる。

【0117】

本発明の薬学的組成物は、有効量のISNAならびに必要なに応じて抗原および／または必要なに応じて薬学的に受容可能なキャリア中に含まれる他の治療剤を含む。用語「薬学的に受容可能なキャリア」は、ヒトまたは脊椎動物への投与に適した1つ以上の適合性の、固体または液体の充填剤、希釈剤またはカプセル化物質を意味する。用語「キャリア」は、活性な成分が適用を容易にするために合わされる、天然または合成の有機成分または無機成分を意味する。薬学的組成物の成分はまた、所望の薬学的効果を実質的に損なう相互作用がないような様式で、本発明の化合物と互いに混ぜ合わされ得る。

【0118】

種々の投与経路が利用可能である。選択される特定の様式は、当然、選択される特定のアジュバントまたは抗原、処置される特定の状態、および治療効果のた

めに必要とされる投薬量に依存する。本発明の方法は、一般的に言うと、医学的に受容可能である任意の投与様式（これは、臨床的に受容可能でない有害効果を引き起こさずに、効果的なレベルの免疫応答を生成する任意の様式を意味する）を用いて実施され得る。好ましい投与様式は、上記に議論される。

【0119】

組成物は、単一投薬形態で好都合に提示され得、そして薬学の分野で周知の任意の方法によって調製され得る。全ての方法は、化合物を、1つ以上の付属成分を構成するキャリアと結合させる工程を包含する。一般的に、組成物は、均一かつ完全に、この化合物を、液体キャリア、細かく分離された固体キャリア、またはこれらの両方と結合させ、次いで必要な場合、生成物を成形することによって調製される。液体用量単位は、バイアルまたはアンプルである。固体用量単位は、錠剤、カプセルおよび坐剤である。患者の処置に関して、化合物の活性、投与様式、免疫の目的（すなわち、予防的または治療的）、障害の性質および重篤度、患者の年齢および体重に依存して、異なる用量が必要であり得る。所定の用量の投与は、個々の用量単位形態での単一投与によってかさもなければ数回の類似した用量単位の両方によって実行され得る。

【0120】

他の送達システムとしては、時間放出送達系、徐放性放出送達系または持続性放出送達系が挙げられ得る。このような系は、化合物の反復投与を回避し得、被験体および医師に対する簡便性を増加する。多くの型の放出送達系が利用可能であり、そして当業者に公知である。これらとしては、ポリマーベースの系（例えば、ポリ（ラクチド-グリコリド）、コポリオキサレート、ポリカプロラクトン、ポリエステルアミド、ポリオルトエステル、ポリヒドロキシ酪酸、およびポリ無水物）が挙げられる。薬物を含む上記ポリマーのマイクロカプセルは、例えば、米国特許第5,075,109号に記載される。送達系としてはまた、非ポリマー系（コレステロール、コレステロールエステルおよび脂肪酸のようなステロールまたはモノグリセリド、ジグリセリドおよびトリグリセリドのような中性脂肪を含む脂質；ヒドロゲル放出系；シラスティック系；ペプチドベースの系；ワックスコーティング；従来の結合剤および賦形剤を用いて圧縮された錠剤；部分

的に融合されたインプラントなど）が挙げられる。特定の例としては、（a）本発明の薬剤がマトリックス内の形態で含まれる侵食系（例えば、米国特許第4, 452, 775号、同第4, 675, 189号、および同第5, 736, 152号に記載されるもの）、および（b）活性成分がポリマーから制御された速度で浸透する拡散系（例えば、米国特許第3, 854, 480号、同第5, 133, 974号、および同第5, 407, 686号に記載される）が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、ポンプベース機材の送達系が使用され得、これらのいくつかは、移植に適用される。

【0121】

本明細書中に使用される場合、IFN- α の投与を要する方法は、所望の治療結果を達成する目的を伴うIFN- α の投与によって被験体を処置するための臨床方法あてはまる。IFN- α が確立された治療剤である多くの臨床徴候が存在する。IFN- α 処置の必要がある被験体は、IFN- α が確立された治療剤である臨床徴候を有する。これらの臨床徴候としては、特定のウイルス感染および特定の増殖障害、顕著には、癌および前癌状態が挙げられる。IFN- α が米国において現在使用を承認されているウイルス感染は、B型肝炎、C型肝炎、および尖圭コンジローム（性病いぼまたは肛門性器いぼ）である。IFN- α が米国において現在使用を承認されている新生物は、ヘアリーセル白血病、皮膚T細胞白血病、慢性骨髄性白血病（CML）、非ホジキンリンパ腫、悪性黒色腫、およびAIDS関連カポジ肉腫である。米国外において、IFN- α はまた、膀胱細胞癌腫、結腸癌腫、腎細胞癌腫、多発性骨髄腫、頸部形成異常、および喉頭乳頭腫症のための臨床使用である。IFN- α 処置に関して調査下である他の徴候としては、他のウイルス感染ならびに例えば、ベーチェット病、HIV、前立腺癌、小細胞肺癌、膵臓癌、扁平上皮細胞癌腫、神経膠腫、および悪性胸膜中皮腫などを含む他の癌が挙げられる。

【0122】

本明細書中に使用される場合、IFN- α を含む薬学的組成物は、薬学的使用に適した組換えまたは天然のIFN- α の調製物に関する。IFN- α は、天然の材料（例えば、白血球、骨髄球、リンパ球）もしくはこれらから誘導された材

料（例えば、細胞株）、または組換えDNA技術を用いて調製されたものから誘導され得る。IFN- α のクローニングおよびこの直接発現（特に、*Escherichia coli*において）の詳細は、多くの刊行物の対象である。組換えIFNの調製は、例えば、Grayら、*Nature* 295:503-8（1982）、Goeddelら、*Nature* 284:316-20（1980）、Goeddelら、*Nature* 290:20-26（1981）、およびEP 174143から公知である。米国において、IFN- α は、組換えヒトIFN- α 2a（ROFERON-A）、組換えヒトIFN- α 2b（INTRON A）として、そして精製された天然IFN- α n3（ALFERON N）として利用可能である。米国外では、IFN- α はまた、精製された天然IFN- α n1（WELLFERON）として利用可能である。

【0123】

本明細書中に使用される場合、IFN- α 単独のための臨床的に確立された有効量は、IFN- α のバイオアベイラビリティを増加する別の薬剤の非存在下で投与される組換えまたは天然のIFN- α 用量を参照し、これは、特定の臨床徴候に対して標準的な推奨用量である。しかし、IFN- α 単独のための臨床的に確立された有効量は、他の薬剤または処置様式（例えば、従来の化学療法、放射線治療、抗ウイルス剤および手術）と組み合わせたIFN- α の使用を含み得る。大多数の被験体において、特定の臨床徴候のためのIFN- α の標準的な推奨用量は、所望の臨床効果を発揮するために予測される。所定の被験体における所定の臨床適用において、IFN- α 単独のための臨床的に確立された有効量はまた、その被験体の状態を処置するためにその被験体において有効であると予測されているかまたは予測される、IFNの用量を参照し得る。例えば、被験体は、標準の推奨用量よりも少ないIFN- α 単独用量に対して応答性であるかもしれない。逆に、被験体は、IFN- α 処置の実際の副作用または予想される副作用に起因して、臨床的に確立された有効用量を寛容し得ないかもしれない。

【0124】

任意の治療化合物に関する最大許容用量（MTD）は、その臨床評価の一部として同定される。例えば、フェーズI試験は、最大許容用量、用量一境界毒性（

DLT) および試験化合物の薬物動態学の決定を含み得る。従って、食品医薬品局 (FDA) で承認された任意の治療化合物のMTDは、公的な記録として当業者に公知である。任意の特定の治療化合物に関するMTDは、その処方 (例えば、注射可能な処方、移植可能な生物侵食可能な (bioerodible) ポリマー処方、経口処方)、送達経路 (例えば、静脈内、経口、腫瘍内)、投与様式 (例えば、注入、ボラス注射)、投与スケジュール (例えば、時間ごと、日ごと、週ごと) などによって変化し得る。MTD頻度は、その薬物を投与された被験体の50%が用量一境界毒性を発生する最も高い用量レベルとして規定される。臨床的に明らかでありそして一般的に受け入れられている他の定義が、当業者に公知である。

【0125】

種々の型のIFN- α に関するMTDの例は、種々の投与経路、徴候、他の薬剤との組み合わせおよび臨床設定を含む研究において公開されている。1つの研究において、組換えIFN- α 2aのMTDは、皮膚T細胞リンパ腫 (菌状息肉腫およびセザリー症候群) の処置に対して光線療法と組み合わせて1週間に3回筋内に提供された場合、1800万国単位 (IU) であった。Kuzel T Mら、J Natl Cancer Inst 82:203-7 (1990)。独立した研究において、皮膚T細胞リンパ腫の処置に関するIFN- α 2bのMTDは、1週間に3回筋内に提供された場合、1800万IUであることが見出された。Qiu BおよびChen M Chin Med J (Engl) 109:404-6 (1996)。IFN- α 2aに対するMTDはより低く、直腸癌に対して高い用量の骨盤照射を受けている患者に関して、1週間に3回皮下的で、300万IUであった。Perera Fら、Int J Radiat Oncol Biol Phys 37:297-303 (1997)。IFN- α 2bに対するMTDは、細胞傷害性化学療法後にAIDS関連カポジ肉腫を有する患者に関して、毎日、1000万IUであった。Gill P Sら、J Biol Response Mod 9:512-6 (1990)。さらに別の研究において、IFN- α 2bのMTDは、転移直腸結腸癌を有する患者に対して、5-フルオロウラシルおよびロイコボリンと組み合わせて24

時間注入として毎週の場合、 1800 万 IU/m^2 であった。Cascinu Sら、Anticancer Drugs 7:520-4 (1996)。

【0126】

最大許容用量の測定は、被験体の体重あたりの薬物重量、体表面積あたりの薬物重量などとして表現され得る。抗癌化合物のMTDは、しばしば、体表面積の平方メートルあたりの重量 (mg/m^2) として表現される。MTDはまた、時間成分に対する用量、例えば、1日あたりの体表面積あたりの薬物重量として表現され得る。

【0127】

ヒト臨床試験に未だ供されていないか、またはヒトにおけるMTDの任意の決定に供されていない治療物質（例えば、実験化合物または非常に毒性の化合物）に関して、当業者は、動物モデルを使用することによってMTDを概算し得る。動物におけるMTDの算出は、多数の生理学的パラメーター（例えば、死、特定の毒性、および薬物誘導の体重減少）に基づき得る。死を終点として使用すると、MTDは、試験群の各メンバーが生存する試験動物を提供する最も高い用量であり得る。毒性を終点として使用すると、MTDは、重篤ではなく適度な毒性が観察される用量であり得る。体重減少を終点として使用すると、MTDは、それより上で特定のパーセントの体重変化が誘導される用量であり得る。動物モデルおよび種々の終点を用いてMTDを決定するための他の方法は、当業者に公知である。治療化合物に関する動物MTDからヒトMTDへの相関は、薬学分野において受容されている慣例である。

【0128】

従って、1つの局面において、本発明は、被験体、好ましくはヒト被験体への投与のための組成物および処方物を提供し、これらは、インターフェロンに関して最大許容用量よりも下の量のインターフェロンを含む。

【0129】

本発明の1つの局面において、 $\text{IFN-}\alpha$ の投与と組み合わせた有効量の単離されたISNAの同時投与を必要とする、 $\text{IFN-}\alpha$ を用いた処置が必要な被験体を処置するための改善された方法が提供される。本明細書中に使用される場合

、単離されたISNAの有効量は、IFN- α を産生するための細胞を引き起こす単離されたISNAの量をいう。1つの好ましい実施形態において、単離されたISNAの有効量は、インビボでIFN- α を産生するための細胞を引き起こす単離されたSINAの量をいう。別の好ましい実施形態において、単離されたISNAの有効量は、インビトロでIFN- α を産生するための細胞を引き起こす量に対応した、単離されたISNAの量をいう。別の好ましい実施形態において、単離されたISNAの有効量は、外因性IFN- α の投与のみから生じる対応するレベルより上の、局所または循環しているIFN- α 量における増加を引き起こす、単離されたISNAの量をいう。別の好ましい実施形態において、単離されたISNAの有効量は、ISNAなしで得られるより上の、外因性IFN- α の治療効果を増加する単離されたISNAの量をいう。さらに別の実施形態において、単離されたISNAの有効量は、オリゴヌクレオチドがより低い用量のIFN- α と同時投与された場合に所定の量のIFN- α に対して達成されるものと同じ治療効果を可能にする、単離されたISNAの量をいう。

【0130】

本明細書中に使用される場合、用語、同時投与は、少なくとも2つの薬剤を臨床的に互いに関連して投与することをいう。同時投与は、少なくとも2つの薬剤を、一緒または連続して投与することを含み得る。好ましい実施形態において、IFN- α の局所濃度または全身濃度が、同じ量のIFN- α 単独を投与することによって達成されるIFN- α の対応する濃度よりも増加される場合、ISNAは、IFN- α を投与する前、同じ時、または後のいずれかで投与される。同時投与は、ISNAの投与に対して時間が十分に近接したインターフェロン- α の投与を意味し、その結果、これらの効果は、いずれか1つが単独で同じ用量で投与される場合に達成される効果よりも大きい効果である。好ましくは、この効果は、少なくとも付加的である。これらはまた、異なる様式（例えば、インターフェロンを全身的に投与し、そしてISNAを局所的に投与するなど）を介して投与され得る。

【0131】

同時的な同時投与を含む特定の実施形態において、IFN- α およびISNA

は、単一処方物として調製され得る。同時的な同時投与を含む別の実施形態において、 $IFN-\alpha$ およびISNAは、別々に調製され、そして投与され得る。この後者の場合、個々の $IFN-\alpha$ およびISNA処方物は、同時的な投与に関する指示書を有するキットとして共にパッケージングされ得る。同様に、連続的な同時投与を必要とする実施形態において、個々の $IFN-\alpha$ およびISNA処方物は、これらの連続的な投与に関する指示書を有するキットとして共にパッケージングされ得る。

【0132】

本明細書中に使用される場合、局所的に投与されることは、 $IFN-\alpha$ の全身濃度を超える $IFN-\alpha$ の局所濃度を達成する経路による投与をいう。例えば、特定の病変または器官への局所投与は、この病変もしくは器官への直接注入によってか、または処置される病変もしくは器官と結合し、供給している輸入性血管への直接注入によって達成され得る。例示的な肝臓への局所投与において、局所投与は、肝動脈、腹腔動脈、または門脈への注射または注入によって達成され得る。

【0133】

別の局面において、本発明は、 $IFN-\alpha$ 処置が必要な被験体の $IFN-\alpha$ 処置を補完する方法を提供し、ここで、有効量の $IFN-\alpha$ および単離されたISNAは、両方とも被験体へ投与される。ISNAによって誘導された $IFN-\alpha$ は、被験体へ直接投与される $IFN-\alpha$ を補完し、従って、所定の用量の $IFN-\alpha$ の臨床効果を拡大する。さらに、ISNA誘導 $IFN-\alpha$ は、代表的には、複数のサブタイプを誘導し、一方直接投与された $IFN-\alpha$ は代表的に単一サブタイプのみを含むので、 $IFN-\alpha$ 処置によって与えられた生物学的効果の範囲はまた、ISNAおよび $IFN-\alpha$ の同時投与によって拡大される。

【0134】

本発明はまた、被験体の $IFN-\alpha$ 処置の効果を増加する方法を提供する。本発明のこの局面に従う方法は、 $IFN-\alpha$ を用いた処置が必要な被験体に $IFN-\alpha$ を含む薬学的組成物を投与する工程、およびこのような処置が必要な被験体に、投与される $IFN-\alpha$ と一緒に $IFN-\alpha$ 処置に効果的である量のISNA

を含む薬学的組成物を投与する工程（ここで、 $\text{IFN-}\alpha$ 処置の効果は、 ISNA の同時投与がない場合に同じ量の $\text{IFN-}\alpha$ を投与する効果よりも大きい）を含む。

【0135】

本明細書中に使用される場合、被験体の $\text{IFN-}\alpha$ 処置の効果を増強する方法またはこの効果を増加する方法は、所定の用量の $\text{IFN-}\alpha$ を被験体へ投与する効果が、同じ用量の $\text{IFN-}\alpha$ を用いた場合に予期または事前に観察されるものよりもより大きな臨床効果を引き起こす方法をいう。好ましい実施形態において、この方法は、 IPC による $\text{IFN-}\alpha$ の産生を誘導するのに有効な量である量の ISNA を同時投与することを含む。この方法において局所的または全身的に達成される $\text{IFN-}\alpha$ の量は、投与された $\text{IFN-}\alpha$ および誘導された $\text{IFN-}\alpha$ の両方からの寄与を反映し、これによって、所定の用量の投与された $\text{IFN-}\alpha$ に対して増強した効果の $\text{IFN-}\alpha$ 処置を達成する。この増加した効果は、例えば、処置に対するより大きな程度の応答、処置に対するより迅速な応答経過、または処置レジメンとの改善したコンプライアンスとして明らかにされ得る。

【0136】

本発明の別の局面に従って、 $\text{IFN-}\alpha$ を用いた処置が必要な被験体を処置するのに効果的な $\text{IFN-}\alpha$ の用量を減少するための方法が、提供される。この方法は、 $\text{IFN-}\alpha$ を用いた処置が必要な被験体へ、 $\text{IFN-}\alpha$ を含む薬学的組成物を投与する工程、およびこのような処置が必要な被験体へ、投与される $\text{IFN-}\alpha$ と一緒に、 $\text{IFN-}\alpha$ 処置に効果的である量で免疫刺激核酸を含む薬学的組成物を同時投与する工程（ここで、投与される $\text{IFN-}\alpha$ の量は、免疫刺激核酸の同時投与なしで必要とされる $\text{IFN-}\alpha$ の量よりも少ない）を含む。

【0137】

本明細書中に使用される場合、被験体を処置するのに効果的な $\text{IFN-}\alpha$ の用量を減少する方法は、 $\text{IFN-}\alpha$ が、被験体の状態を処置する際に所望される臨床効果を達成しながら、以前に確立された量および頻度と比較して減少されている量および頻度で、被験体に投与される方法をいう。好ましい実施形態において

、投与量は、例えば、IFN- α 単独の慣習的または最大許容用量よりも少なくとも10パーセント下の量まで、臨床的に決定された程度で減少され得る。他のより好ましい実施形態において、IFN- α 投与量は、IFN- α 単独の慣習的または最大許容用量よりも少なくとも20パーセント、少なくとも30パーセント、または少なくとも40パーセント下の量まで、臨床的に決定された程度で減少され得る。最も好ましい実施形態において、IFN- α 投与量は、IFN- α 単独の慣習的または最大許容用量よりも少なくとも50パーセント下の量まで、臨床的に決定された程度で減少され得る。別の好ましい実施形態において、投与頻度は、IFN- α 単独の慣習的または最大許容用量よりも例えば少なくとも10パーセント下の頻度まで、臨床的に決定された程度で減少され得る。他のより好ましい実施形態において、IFN- α 投与頻度は、IFN- α 単独の慣習的または最大許容用量よりも少なくとも20パーセント、少なくとも30パーセント、または少なくとも40パーセント下の頻度まで、臨床的に決定された程度で減少され得る。最も好ましい実施形態において、IFN- α 投与頻度は、IFN- α 単独の慣習的または最大許容用量よりも少なくとも50パーセント下の頻度まで、臨床的に決定された程度で減少され得る。

【0138】

本発明のさらに別の局面は、IFN- α を用いた処置をうけるかまたはその必要がある被験体において、IFN- α 処置関連副作用を回避する方法である。この方法は、IFN- α を用いた処置が必要な被験体へ、IFN- α を含む薬学的組成物を投与する工程、およびこのような処置が必要な被験体へ、投与されるIFN- α と一緒に、IFN- α 処置に効果的である量で免疫刺激核酸を含む薬学的組成物を同時投与する工程（ここで、IFN- α 処置関連副作用の影響は、IFN- α が免疫刺激核酸の同時投与なしで投与される場合の副作用との比較において減少されている）を包含する。

【0139】

IFN- α に関するアッセイは、当該分野で周知である。これらとしては、直接試験（例えば、少なくとも1つのIFN- α に特異的である酵素結合イムノソルベント検定法（ELISA））、および間接試験（例えば、NK細胞活性化／

細胞傷害性 (Trinchieri G Adv Immunol 47:187-376 (1989)) およびクラスⅡ MHCに関する蛍光活性化細胞分類 (FACS) 分析による表現型決定を含む機能試験) が挙げられる。当該分野で周知であるさらなる特異的アッセイ方法は、IFN- α の局所濃度または局所存在が目的である設定において得に有用であり得；これらの方法としては、例えば、免疫組織化学、核酸ハイブリダイゼーション (例えば、ノーザンブロッティング)、ウエスタンブロッティング、逆転写酵素/ポリメラーゼ連鎖反応 (RT/PCR)、およびインサイチュRT/PCRが挙げられる。さらなる方法 (フローサイトメトリーによる細胞内IFN- α の検出を含む) が、以下の実施例6に開示される。

【0140】

本明細書中に使用される場合、被験体におけるIFN- α 処置関連副作用を回避する方法は、IFN- α 処置を受ける被験体によって経験されるIFN- α 処置関連副作用の発生または重篤度を減少する方法をいう。本明細書中に使用される場合、IFN- α 処置関連副作用は、被験体へのIFN- α の投与結果として被験体中で誘導される臨床副作用である。多数のこのような副作用が、臨床経験および臨床試験を通じて十分に文書化されている。このような副作用は、しばしば、被験体において用量-境界的である。最も一般的に遭遇する全身性IFN- α 処置関連副作用としては、以下が挙げられる：インフルエンザ様症候群、熱、頭痛、悪寒、筋肉痛、疲労、食欲不振、悪心、嘔吐、下痢、鬱病、甲状腺機能亢進症、好中球減少症および貧血。好ましい実施形態において、IFN- α 処置関連副作用は、十分に減少されて、IFN- α 処置とのよりいっそうのコンプライアンスを促進する。別の好ましい実施形態において、IFN- α 処置関連副作用は、十分に減少されて、さもないと副作用によって排除されるIFN- α 処置の再開を可能にする。別の好ましい実施形態において、IFN- α 処置関連副作用は十分に減少されて、IFN- α 処置の強化を可能にする。

【0141】

本発明の別の局面において、IFN- α 処置が必要な被験体においてこのような処置の効果を増強するための第2の方法が、提供される。この方法は、このよ

うな処置が必要な被験体に、この被験体の状態を処置するのに有効な量のIFN- α を含む薬学的組成物を投与する工程、ドナーから天然のインターフェロン産生細胞（IPC）を単離する工程、この単離されたIPCを、エキソピボで、IFN- α を放出するためにIPCを誘導するのに有効な量の免疫刺激核酸を含む薬学的組成物と接触させる工程、およびこの接触された細胞を被験体へ投与する工程を包含する。ドナーおよび被験体は、単一個体であり得るか、またはこれらは、異なる個体であり得る。特定の実施形態において、接触された細胞は、処置される標的組織を供給する血管へ局所様式で（例えば、注射または注入を介して）被験体に投与される。本発明のこの局面に従う方法は、必要に応じて、単離されたIPCを抗原と接触させる工程を包含し得る。特定の実施形態において、この方法はまた、単離されたIPCを、増殖因子（IPCはこれら自身を産生しない）と接触させる工程を包含し得る。IPCによって産生されないこのような増殖因子としては、例えば、IL-3またはGM-CSFが挙げられ得、そしてIL-8およびTNF- α を除外する。

【0142】

本明細書中に使用される場合、用語、増殖因子は、成熟および有糸分裂を引き起こすための応答性の細胞型を誘導する可溶性シグナル伝達因子をいう。増殖因子の分類としては、多数のサイトカイン、増殖因子それ自身、およびホルモンが挙げられる。増殖因子の特定の例としては、IL-1、IL-2、IL-3、IL-6、GM-CSF、G-CSF、PDGF、TGF- β 、NGF、IGF、増殖ホルモン、エリスロポイエチン、トロンプオイエチンなどが挙げられるが、これらに限定されない。天然に存在する増殖因子に加えて、増殖因子アナログおよび融合タンパク質のような増殖因子誘導体が、本発明の目的のために使用され得る。

【0143】

本明細書中に使用される場合、用語、天然のインターフェロン産生細胞（IPC）は、エンベロープウイルス、細菌および腫瘍に応じるIFN- α の主要な産生者である特定化された白血球型をいう。IPCは、低い頻度で末梢血単核細胞（PBMC）および扁桃組織中に存在する系譜陰性（lin⁻）/CD4⁺/M

HC クラスII+細胞である。Siegal FPら、Science 284:1835-7 (1999) ; Grouard Gら、J Exp Med 185:1101-11 (1997)。正常な個体におけるPBMC中のIPCの頻度は、0.2と0.6との間のパーセントで変化する。これらは、系譜マーカーCD3 (T細胞)、CD14 (単球)、CD19 (B細胞) およびCD56 (NK細胞) の非存在下、CD11cの非存在下、ならびにCD4、CD123 (IL-3レセプター α 、IL-3R α) およびMHCクラスIIの発現によって特徴付けられる。Grouard Gら、J Exp Med 185:1101-11 (1997) ; Risoan M-Cら、Science 283:1183-86 (1999) ; Siegal FPら、Science 284:1835-7 (1999) ; Celli Mら、Nat Med 5:919-23 (1999)。

【0144】

本明細書中に使用される場合、被験体からIPCを単離することは、被験体からIPCを含む体液もしくは組織を取り除くプロセス、および少なくとも1パーセントの細胞がIPCである程度まで体液もしくは組織からのIPCを富化するプロセスをいう。最も好ましい実施形態において、少なくとも99パーセントの細胞がIPCである。別の好ましい実施形態において、少なくとも95パーセントの細胞がIPCである。別の好ましい実施形態において、少なくとも90パーセントの細胞がIPCである。別の好ましい実施形態において、少なくとも80パーセントの細胞がIPCである。別の好ましい実施形態において、少なくとも70パーセントの細胞がIPCである。別の好ましい実施形態において、少なくとも60パーセントの細胞がIPCである。別の好ましい実施形態において、少なくとも50パーセントの細胞がIPCである。別の好ましい実施形態において、少なくとも40パーセントの細胞がIPCである。別の好ましい実施形態において、少なくとも30パーセントの細胞がIPCである。別の好ましい実施形態において、少なくとも20パーセントの細胞がIPCである。別の好ましい実施形態において、少なくとも10パーセントの細胞がIPCである。別の好ましい実施形態において、少なくとも5パーセントの細胞がIPCである。富化する工

程は、一連の選択工程によって達成され得、この工程は、例えば、細胞を、系譜マーカーに対して特異的な抗体（例えば、抗CD3、抗CD11c、抗CD14、抗CD16、抗CD19、抗CD56）と結合した磁気ビーズと接触させ、次いで、接触されたこの細胞を強い磁場の存在下で除去カラムを通過することによる、系譜陽性細胞の陰性選択；除去カラムを通過する細胞を抗CD4と結合されたマイクロビーズと接触させ、この接触された細胞を陽性選択カラム上を通過させることを含む陽性選択；ならびに抗CD123および抗MHCクラスIIを用いる蛍光活性化細胞分類（FACS）によるIPCのさらなる増強を含み得る。少なくとも1パーセントの生存細胞がIPCである程度まで（lin⁻）/CD4⁺/CD123⁺/MHC クラスII⁺インターフェロン産生細胞の単離および富化を引き起こす場合、他の方法が、当業者に理解されるように、等しい効果に対して使用され得る。

【0145】

本発明のさらに別の局面において、インビトロにおいて天然のインターフェロン産生細胞（IPC）の生存を支持するための方法が、提供される。この方法は、被験体から（上記のように）IPCを単離する工程、組織培養に適した滅菌培地中でIPCを培養する工程、およびインビトロでIPCを、インターロイキン3（IL-3）の非存在下でIPCの増殖を支持するに有効な量の免疫刺激核酸と接触させる工程を包含する。好ましい実施形態において、IPCは、前駆体2型樹状細胞（pDC2；プラズマ細胞様単球）である。Siegal FPら、Science 284:1835-7（1999）。IPCは、外因性IL-3および/またはGM-CSFの有りまたは（より顕著には）無しのいずれかの適切な組織培養条件下で培養され得る。

【0146】

本明細書中に使用される場合、インビトロでインターフェロン産生細胞（IPC）の生存を支持する方法は、因子を提供すること、またはインビトロ培養物中に配置されたIPCの生存能力を促進するシグナルを誘導することをいう。例えば、IL-3の非存在下、通常多くのIPCは細胞培養物中に配置された3日以内に死ぬ。IPCへのIL-3の添加は、培養物中のIPCの生存を支持する。

本発明のこの局面に従って、IL-3は、IPCが有効量のISNAと接触される場合、インビトロにおけるIPCの生存に必要とされない。

【0147】

別の局面において、本発明は、インビトロにおいて単離されたインターフェロン産生細胞（IPC）を刺激するための方法を提供する。この方法は、被験体から（上記のように）IPCを単離する工程、組織培養に適した滅菌培地中でIPCを培養する工程、およびインビトロでこのIPCを、少なくとも1つのI型のインターフェロンの分泌を誘導するのに有効な量の免疫刺激核酸と接触させる工程を包含する。好ましい実施形態において、この方法によって誘導されるI型インターフェロンは、IFN- α である。上記のように、好ましいIPCは、前駆体2型樹状細胞（pDC2；プラズマ細胞様単球）である。Siegal FPら、Science 284:1835-7（1999）。重要なことには、IPCは、GM-CSFの非存在下および例えば、センダイウイルス、HSVまたはインフルエンザウイルスによるウイルス感染なしで、培養中刺激され得る。活性化は、当該分野で周知の方法を用いてアッセイされ得、これは、細胞表面活性化マーカーCD80のFACS分析およびI型IFNに対するELISAまたはバイオアッセイ（例えば、水疱性口内炎ウイルスに対する線維芽細胞の保護）が挙げられる。

【0148】

本明細書中に使用される場合、インビトロにおいて、単離されたインターフェロン産生細胞（IPC）を刺激する方法は、因子を提供すること、またはIPCの大きさ、形態、もしくは細胞表面抗原の発現、転写に変化を引き起こすシグナル、またはこの因子もしくはシグナルの非存在下においてIPCに特徴的でない分泌産物を誘導することをいう。ウイルス感染によって提供されるシグナル、CD40L連結、またはGM-CSFの非存在下において、新鮮に単離されたIPCは、8~10 μ mの直径を有するなめらかな円形のリンパ形態を示し、その細胞表面にCD80またはCD86を発現しない。Grouard Gら、J Exp Med 185:1101-11（1999）。同様に、新鮮に単離されたIPCは、IFN- α を大量に分泌しない。Siegal FPら、Sci

ence 284:1835-7 (1999)。対照的に、IL-3に曝露されたIPCは、インビトロで偽足および不鮮明な形態を発生し、CD80およびCD86をその表面上に発現し、そして紫外線照射された単純疱疹ウイルス、センドライウイルス、または熱殺傷Staphylococcus aureusに対して曝露される場合、大量のI型IFN (IFN- α およびIFN- β) を分泌する。Grouard Gら、J Exp Med 185:1101-11 (1999) ; Siegal FPら、Science 284:1835-7 (1999)。本発明のこの局面に従って、ISNAは、ウイルス感染、CD40L連結、またはGM-CSFの代わりに使用されて、インビトロにおいて単離されたIPCを刺激するのに有効なシグナルを誘導し得る。

【0149】

本発明はさらに、被験体のインターフェロン産生細胞 (IPC) を活性化するために被験体を処置するための方法を提供する。この方法は、このような処置が必要な被験体からIPCを単離する工程、IPCをインビトロで培養する工程、インビトロでこのIPCを有効量の単離された免疫刺激核酸と接触させる工程、およびこの接触されたIPCを被験体へ戻す工程を包含する。IPCは、被験体から上記のように単離され、そして適したインビトロ細胞培養条件下で培養物中に配置される。このような培養条件は、必要に応じて、外因性増殖因子 (IL-3またはGM-CSFを含む) の供給を含み得る。しかし、IL-3またはGM-CSFは、本発明の目的に必要とされないかもしれない。この方法に従って、被験体は、IFN- α の薬学的調製物の直接投与を伴わずに処置され得る。IPCの活性化は、同様に得られ培養されたがISNAと接触されていないIPCに対してなされた参照物を用いて、上記のようにアッセイされ得る。

【0150】

さらに別の局面において、本発明は、多数のI型IFNサブタイプの産生を刺激するための方法を提供する。この方法は、IPCを、少なくとも2つのI型インターフェロンの分泌を誘導するのに有効な量の、免疫刺激核酸と接触させる工程を包含する。1つの実施形態において、IPCは、インビボでISNAと接触させられる。別の実施形態において、IPCは、単離され、そして／または適切

な細胞培養条件下においてインビトロでISNAと接触される。種々の他の実施形態は、少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個、少なくとも6個、少なくとも7個、および少なくとも8個のI型IFNサブタイプの誘導を引き起こす。種々のサブタイプは、当該分野で十分に記載される方法を用いて決定され得、そして当業者に公知であり、例えば、サブタイプ特異的ELISA、アミノ末端配列決定および質量分析法(MS)である。

【0151】

マトリックス補助レーザー脱着/イオン化飛行時間型(MALDI TOF)-MSおよびエレクトロスプレーイオン化(ESI)-MSは、現在、フェムtomol量で利用可能なペプチドを同定するために使用される標準的な方法である。Mann MおよびTalbo G Curr Opin Biotechnol 7:11-19 (1996); Mann MおよびWilm M Trends Biochem Sci 20:219-24 (1995); Mann Mら、Anal Chem 61:1702-8 (1989)。個々のバンドは、ポリアクリルアミドゲルから切り出され、トリプシンを用いて切断され、次いで、溶出されて、MALDI TOF-MSまたはESI-MS分析に供されるペプチドフラグメントを生じる。MSからの質量/電荷のデータ、トリプシン消化の切断部位特異性、およびペプチド配列データの組み合わせは、個々のタンパク質およびペプチドの同定を可能にする。MALDI TOF-MS分析は、切断され分析されたタンパク質の質量フィンガープリントを提供する。このフィンガープリントは、完全に配列決定されたタンパク質に対応する算出されたペプチド質量のデータベースに対してスキャンするためのみに有用である。ESI-MS分析は、より困難であるが、これは、完全な配列データまたは部分的な配列データのいずれかへの比較に基づく同定を可能にする。いずれかの方法に関する質量の精度は、0.01パーセントを超え得、すなわち、10kDa辺り1Daである。

【0152】

別の局面において、本発明は、I型IFNが $\gamma\delta$ T細胞の活性化および増殖を誘導する発見に関する。この $\gamma\delta$ T細胞は、一般的なホスフェート含有非ペプチ

ド抗原に応答する前活性化段階の抗原特異的T細胞である。 $\gamma\delta$ T細胞抗原の例としては、熱殺傷マイコバクテリア由来のホスフェート含有非ペプチド分子；イソペンテニルピロリン酸（IPP）および関連プレニルピロリン酸誘導体；モノエチルホスフェート；ならびにヌクレオシドおよびデオキシヌクレオシド三リン酸の γ -モノエチル誘導体が挙げられる。Tanaka Yら、Nature 375:155-8 (1995)。以前の研究により、 $\gamma\delta$ T細胞が種々のリンホカイン（lymphokine）を分泌し、そして細胞溶解応答を起こし得ることが示された。例えば、 $\gamma\delta$ T細胞のこれらのホスフェート含有非ペプチド抗原への曝露は、APCの非存在下においてIFN- γ 産生を刺激する。明らかにT細胞系譜に属するが、ヒト $\gamma\delta$ T細胞は、 α/β T細胞とは明らかに異なり、そしてこれらは、NK細胞といくつかの特徴を共有する。 $\gamma\delta$ 細胞がマイコバクテリア感染によって引き起こされた病変に凝集し、ウイルス非特異的様式でウイルス感染された細胞に応答し、抗原プロセッシングも抗原提示細胞のいずれも必要とせず、そしてこれらが優先的に種々の上皮に局在するという発見は、一緒になって、 $\gamma\delta$ 細胞が、パターン認識に応答性であり、そして防御の第1線を担い得ることを示唆する。

【0153】

IFN- γ およびパーフォリンの産生によって測定された場合に、IPPと組み合わせたCpG ODNが、PBMC内に存在するヒト $\gamma\delta$ T細胞の活性化を相乗的に誘導することが、本発明のこの局面に従って発見された。さらに、IPPと組み合わせたCpG ODNが、PBMC内に存在するヒト $\gamma\delta$ T細胞の増殖を相乗的に誘導することがまた、本発明のこの局面に従って発見された。これらの効果は、 $\gamma\delta$ T細胞をPBMCから単離することによってか、またはI型IFNに対する中和抗体の添加によって排除され、そしてこれらは、組換えI型IFNの添加によって再び産生された。著しく、ODN2216および1585（両方ともI型IFNの強力なインデューサー）は、ODN2006よりも $\gamma\delta$ T細胞に対してその効果がより強力であった。

【0154】

ヒトにおいて、Th1応答は、IL-12および/またはIFN- γ によって

駆動される。IL-12およびIFN- α/β の両方は、T細胞およびNK細胞においてIFN- γ 合成を促進する。IL-12が $\gamma\delta$ T細胞を促進してIFN- γ を分泌することが以前に知られた。IFN- β はIL-12産生をダウンレギュレートすることが記載されているので、I型IFNを誘導するISNAによって発揮されるIL-12産生に対する効果を研究するために実験が実行された。これらの実験（実施例13）の結果は、特定のCpG ODNがCD40依存性IL-12p70産生を、IL-12p40 mRNA産生に対するIFN- α/β 媒介陰性フィードバック機構によって抑制することを示した。従って、CD40Lを介するT細胞および抗原提示細胞の相互作用は、IL-12またはIFN- α/β によって支配されるサイトカイン環境を導く。両者がTh1応答を促進するが、I型IFNよりも良好なB細胞活性化のインデューサーであるCpG ODNは、ナイーブT細胞のプライミングに関して優れ得、そして逆に、I型IFNの強力なインデューサーであるCpG ODNは、より高い活性を有して、前活性化および記憶T細胞を支持し得る。

【0155】

本発明の別の局面に従って、被験体への投与のためのインターフェロン組成物が、提供される。この組成物は、組換えまたは天然のインターフェロンを、被験体への投与のための容器中に含む。この容器中のインターフェロンの量は、最大許容用量（MTD）よりも少なくとも約10パーセント少ない。好ましくは、この容器中のインターフェロンの量は、MTDより少なくとも約20パーセント下、MTDより少なくとも30パーセント下、MTDより少なくとも40パーセント下、またはさらに、MTDより少なくとも50パーセント下である。他の実施形態において、この容器中のインターフェロンの量は、臨床的に確立された有効用量よりも少なくとも約20パーセント下、30パーセント下、40パーセント下、またはさらに50パーセント下である。この容器はまた、ISNAを含み得る。

【0156】

本発明のさらに別の局面において、インターフェロンおよびISNAを被験体へ投与するためのキットが、提供される。キット11を描く図18を参照して、

このキットは、IFN- α を含む組成物17を含む容器19および最大許容用量(MTD)よりも少なくとも約10パーセント下、MTDよりも20パーセント下、MTDよりも30パーセント下、MTDよりも40パーセント下、またはMTDよりも50パーセント下の量での、このような処置が必要な被験体へのインターフェロンの投与に関する指示書21を備える。このキット11は、同じ容器または別の容器19中に、ISNAを備え得る。このキットはまた、IFN- α を用いた処置に対して感受性である状態を有する患者を処置するための指示書21を備え得る。このような状態の例(増殖およびウイルス)は、上記に記載されるようなものである。キット11はまた、箱様パッケージ15を備える。

【0157】

本発明は、さらに以下の実施例によって例示され、これらは、さらなる限定としていづれにも構築されるべきではない。本願を通じて引用される全ての参考文献(論文の参考文献、発行された特許、公開された特許出願、および同時係属中の特許出願を含む)の全内容は、本明細書によって参考として明確に援用される。

【0158】

(実施例)

(実施例1 IPCの単離及び特徴付け)

末梢血単核細胞(PBMC)は合計0.2~0.4パーセントのIPCを含有しており、そしてこれらは系譜マーカー(CD3、CD14、CD16、CD19、CD20、CD56)の欠如によって特徴付けられ、そして他の系譜陰性細胞とはCD4、CD123(IL-3R α)及びMHCクラスIIの発現によって識別することができる。

【0159】

IPCは、VARIOMACS技術(Milteny Biotec, Auburn, CA)及び以前に記載された技術を使用して末梢血液から単離された。O'Doherty U等、J Exp Med 178:1067~1076(1993年)。PBMCは、以前に記載されたようにしてFicoll-Paque密度勾配遠心分離法(Histopaque-1077, Sigma)に

よって健康な血液ドナーの軟膜から取得された。Hartmann G等、Antisense Nucleic Acid Drug Dev 6:291~299 (1996年)。CD3 (UCHT1)、CD14 (M5E2) 及びCD19 (B43) に対するモノクローナル抗体はPharMingen (San Diego) から購入した。PBMCは、コロイド状超常磁気マイクロビーズと結合体化した抗CD3、CD14、CD16、CD19及びCD56抗体と共にインキュベートし、そして強磁場中で除去カラムを通過させた。通過中で得られた系譜陰性 (line-) 細胞をCD4に対するマイクロビーズ結合体化抗体と共にインキュベートし、そして陽性選択カラムを通過させた。line-/CD4+細胞からIPCの>99パーセントまでの更なる精製は、フィコエリトリン (PE) 標識抗CD123及びFITC標識抗MHCクラスIIを使用して蛍光活性化細胞分類 (FACS) で達成された。

【0160】

表面抗原染色は以前に記載されたようにして実施した。Hartmann G等、J Pharmacol Exp Ther 285:920~928 (1998年)。MHCクラスIIに対するモノクローナル抗体 (HLA-DR、Immun-357) 及びCD80に対するモノクローナル抗体 (MAB104) はImmunotech (Marseilles, France) から購入した。他の全ての抗体はPharMingen (San Diego) から購入した：CD3 (UCHT1)、CD14 (M5E2)、CD19 (B43) 及びCD86 (2331 (FUN-1)) に対するmAb。FITC標識IgG1, κ (MOPC-21) 及びフィコエリトリン標識IgG2b, κ を使用して特異的な染色をコントロールした。Lyons AB及びParish CR、J Immunol Methods 171:131~137 (1994年)。

【0161】

フローサイトメトリーデータはFACSscan (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA) で得た。スペクトルのオーバーラップは適切に補償して補正した。分析は、形態学的ゲート内の生育可能な細胞で実施した (前方散乱 (FSC)、側方

散乱 (SSC)、細胞の>94パーセントがMHCクラスII陽性で且つ系譜マーカー陰性)。データはコンピュータープログラムFLOWJO (第2.5.1版、Tree Star, Stanford, CA) で分析した。

【0162】

結果。トリパンプルー排除で測定された生育能力は>95パーセントであった。新たに単離されたIPCは共刺激分子CD80及びCD86について陰性であった。図1は、PBMCから単離されたIPCの磁気ビーズ及びフローサイトメトリーによるFACS分析を描写している。左から右に次のとおり示されている: PBMCからlin-/MHCクラスII+細胞の選択; lin-/MHCクラスII+細胞からCD123+/MHCクラスII+細胞の更なる選択; 及び新たに単離されたlin-/MHCクラスII+/CD123+IPCのCD80-としての特徴付け。

【0163】

(実施例2 CpGオリゴヌクレオチドはインビトロでのIPCの生存及び活性化を支持する。)

新たに単離されたIPCの大部分は、IL-3又はGM-CSFの存在下でインキュベートしなかった場合、3日以内に死滅する。残存している生存細胞は活性化されないか又は弱くしか活性化されない。IPCの細胞培養物にCpGオリゴヌクレオチドは添加されるが、他の増殖因子は添加されない場合、IPCは生存し、そして共刺激分子 (例えば、CD80、図2) の発現増加によって示されるように、高度に活性化されるようになる。

【0164】

新たに単離されたIPC (実施例1参照) を、10パーセント (容量/容量) の加熱不活性化 (56℃、1時間) FCS (HyClone)、1.5mMのL-グルタミン、100単位/mlのペニシリン及び100µg/mlのストレプトマイシン (これらは全て、GIBCO/BRLから) を補充したRPMI 1640培養培地 (完全培地) 中に懸濁した。化合物は全てエンドトキシンを試験して購入した。新たに調製したIPC (最終濃度1ml当たり 5×10^5 個の細胞) を完全培地単独か、又は6µg/mlのホスホロチオエートCpG ODN

2006 (5' - t c g t c g t t t t g t c g t t t t g t c g t t - 3' ; 配列番号147)、100 ng/mlのLPS (*Salmonella typhimurium*由来、Sigma カタログ番号L2262)、800単位/mlのGM-CSF (1.25×10^4 単位/mg、Genzyme)を補充するか若しくはGM-CSFと組み合わせたCpGオリゴヌクレオチドを補充した完全培地中で2日間培養した。IPC上でのCD80及びMHCクラスIIの発現はフローサイトメトリーで試験した(実施例1参照)。

【0165】

結果 5つの独立した実験の代表的な結果は図2に描写する。新たに調製されたIPCにCpG ODN 2006 (配列番号147、 $2 \mu\text{g/ml}$)の単回添加はGM-CSF (800単位/ml)より細胞生存の促進において優れていた(74.3パーセント \pm 5.2パーセント対57.1パーセント \pm 2.3パーセント)。GM-CSFとCpG ODN 2006 (配列番号147)の組合せは生存可能な細胞の数を更に増加させた(81.0パーセント \pm 6.7パーセント)。新たに単離されたIPCをIL-3又はGM-CSF無しで2日間培養すると、LPSを上記培地に加えたときであっても、CD80に対する染色欠如によって示されるように、依然として不活性のままであった。GM-CSFの添加によってCD80が誘導された。CpG ODN 2006 (配列番号147、 $6 \mu\text{g/ml}$)の添加によってIPCはGM-CSF (800単位/ml)より一層大きな程度にまで活性化された。GM-CSFとCpGオリゴヌクレオチドと一緒に存在したとき、IPCの更なる活性化が生じた。これは、IPCの生存支持においてCpGがIL-3及びGM-CSFを代替することを示している。LPSはIPCの生存又は活性化のどちらにも寄与しなかった(図2)。

【0166】

(実施例3・CpGオリゴヌクレオチドはインビトロでIPCを活性化するが、ポリICはIPCを活性化しない。)

IL-3はIPCの優れた生存をもたらすが、IPCを活性化しない。IL-3をCpGオリゴヌクレオチドと組み合わせたとき、CD80の発現は5~20倍増加した(図3)。ポリIC(骨髓性細胞(樹状細胞、マクロファージ)に対

して周知の免疫刺激機能を有する別1つのポリヌクレオチド)はIPCを刺激しなかった。

【0167】

新たに調製されたIPC(実施例1参照、最終濃度1ml当たり 3×10^5 個の細胞)を、 10 ng/ml のIL-3を補充した完全培地(実施例2参照)中で3日間培養した。次いで、IPCの培養は、(a)更なる補充物無しで、(b) $6 \mu\text{g/ml}$ のCpG ODN 2006(配列番号147)を添加した後に、そして(c) $10 \mu\text{g/ml}$ のポリICを添加した後に更に24時間継続した。前方散乱(FSC)、側方散乱(SSC)並びにIPC上でのCD80及びMHCクラスIIの発現はフローサイトメトリーで試験した(実施例1参照)。

【0168】

結果 3つの独立した実験の代表的な結果は図3に示す。IL-3及びCpG ODN 2006(配列番号147、 $6 \mu\text{g/ml}$)を補充した完全培地中で培養したIPCは、IL-3単独を含有する完全培地、又はIL-3及びポリICを補充した完全培地中で培養したIPCより大きくそしてより粒状であった。加えて、IL-3及びCpG ODN 2006(配列番号147、 $6 \mu\text{g/ml}$)を補充した完全培地中で培養したIPCはIL-3単独を含有する完全培地又はIL-3及びポリICを補充した完全培地中で培養したIPCより高度に活性化された。これはCpGオリゴヌクレオチドがインビトロでIPCを活性化することを示している。

【0169】

(実施例4 CpGオリゴヌクレオチドはIPCによるIFN- α 産生を誘導する。)

全PBMC内でのCpGによるI型インターフェロンの誘導は以前に示されている。Sun S等、J Exp Med 188:2335~2342(1998年)。ここで初めて、試験したIFN- α の10個のサブ種のうち9個に特異的なELISAを使用して、IFN- α がCpGオリゴヌクレオチドによって48時間以内にIPC内に誘導されることが示されている。

【0170】

新たに調製されたIPC（実施例1参照、最終濃度1ml当たり 3×10^5 個の細胞）を、 10 ng/ml のIL-3及び800単位/mlのGM-CSF（ 1.25×10^4 単位/mg、Genzyme）を補充した完全培地（実施例2参照）中で2日間培養した。この培養物の半分に $6 \mu\text{g/ml}$ のCpG ODN 2006（配列番号147）を補充した。IFN- α を、IFN- α （ヒトIFN- α 多種ELISA、PBL Biomedical Laboratories、New Brunswick, NJ）及びIFN- β （PBL Biomedical Laboratories、New Brunswick, NJ）に特異的な別個のELISAの組合せを使用し供給者の指示に従って実施して上清液中で測定した。上記の多種IFN- α ELISAは $100 \sim 5000 \text{ pg/ml}$ の範囲を有しており、IFN- α Fを除いて、ヒトIFN- α サブタイプを全て検出し、そしてIFN- β 又はIFN- γ は検出しない。IFN- β ELISAは $250 \sim 10,000 \text{ pg/ml}$ の範囲を有している。

【0171】

結果。3つの独立した実験の代表的な結果を図4に表す。 10 ng/ml のIL-3、800単位/mlのGM-CSF及び $6 \mu\text{g/ml}$ のCpG ODN 2006（配列番号147）を補充した完全培地中で48時間培養したIPCは、CpGオリゴヌクレオチドが添加されていない同様な培養物と比較して、強く誘導されてIFN- α を分泌した。この結果は、CpGオリゴヌクレオチドがヒトIPCを誘導してIFN- α の多数のサブ種を分泌させることを示している。この結果はまた、CpGオリゴヌクレオチドがIPC由来の恒久的細胞株を使用して天然インターフェロンのインビトロ産生を可能にすることも示している。

【0172】

（実施例5 IFN- α およびIFN- β 誘導活性を有するCpG ODNの同定）

3つの連続「ヒト」CpGモチーフ（5' GTCGTT 3'）を含む24マーのCpG ODN 2006（配列番号147）は、ヒトB細胞を活性化する最も強力なCpG配列の1つである。Hartmann Gら、J Immunol 164:944~953（2000）；Hartmann Gら、J Im

munol 164:1617~1624 (2000)。他の微生物刺激因子（例えば、LPSおよびポリ（I:C））と比較して、ODN 2006は、pDC前駆体の生存および活性化を強力に促進する。しかし、NK細胞を活性化するその強力な能力と比較して、pDC中のI型IFNを誘導するODN 2006の能力は、比較的弱い。

【0173】

他のCpG ODNがpDC中のI型IFNを誘導することによってNK細胞を活性化し得るという仮説を試験するために、既知のNK細胞活性を有するCpG ODNのパネルを、それらがPBMCにおけるIFN- α 産生を刺激する能力について試験した。CpG ODNのパネルには、以下のものが含まれ、ここで、小文字はホスホロチオエート結合を示し、大文字はホスホジエステル結合を示し、そしてmは7-デアザグアノシンを示す：

【0174】

【化20】

tcgtcgttttgcgttttcgtt	ODN 2006	(配列番号 147)
ggGGTCAACGTTGAgggggG	ODN 1585	(配列番号 1)
gmGGTCAACGTTGAgggmaggG	ODN 2197	(配列番号 148)
ggGGAGTTCGTTGAgggggG	ODN 2198	(配列番号 149)

ODNは全て、20mg/mlの濃度でTE緩衝液（10mMのTris-HCl、1mMのEDTA、pH8）に溶解した。PBS中に希釈したアリコート（0.4mg/ml）を-20℃で貯蔵し、そして使用前に解凍した。発熱物質不含試薬を全ての希釈物に使用した。ODNを、LALアッセイ（Bio Whittaker, Walkersville, MD；検出下限0.1EU/ml）を使用してエンドトキシンについて試験した。

【0175】

新たに単離されたPBMCを、CpG ODN（3 μ g/ml）と共に48時間インキュベートした。IFN- α を、その上清において、IFN- α の13の

アイソフォームのうち10のアイソフォームを検出するELISAによって測定した。最初に試験した全ての配列の中で、CpG ODN1585（配列番号1）が、PBMCにおいてIFN- α を誘導する最も高い活性を示した。ODN1585は、両末端にポリGそして10マーのパリンドローム内に中央のCpG-ジヌクレオチドを有する、キメラODN（混合ホスホロチオエート-ホスホジエステル骨格）である。Hartmann Gら、J Pharmacol Exp Ther 285:920（1998）。ODN1585は、PBMC中で有意な量のIFN- α を誘導しなかった（ 0.021 ± 0.015 ng/ml； $n=8$ ）ODN2006と比較して、ナノグラム範囲でIFN- α を刺激した（ 1.3 ± 0.4 ng/ml； $n=7$ ）（図5）。コントロールのODN2197（ポリG末端における7-デアザ-グアノシン置換体（G四量体を形成できない））およびODN2198（CGおよびポリG末端を有するが、パリンドロームを有さない）は、本質的に不活性であった（図5）。次いで、ODN1585の配列に基づいて、CpG ODNの新しいパネルを設計した。ポリG末端とパリンドローム内に3つのCGジヌクレオチドを含む、ODN2216（ggGGGACGATCGTCgggggG；配列番号7）は、PBMC中で顕著なIFN- α 誘導活性を有する（ 23.7 ± 5.2 ng/ml； $n=7$ ）いくつか配列中の1例である。

【0176】

CpG ODNは、濃度依存性様式でIFN- α 産生を刺激した（図6）。ODN2216およびODN1585の活性を、 $12 \mu\text{g/ml}$ までの濃度について試験し、ODN2216のより高い能力が、濃度依存性の効果でないことが確認された。 $0.4 \mu\text{g/ml}$ 程度の少ないODN2216が、PBMC中でかなりの量のIFN- α （ 0.7 ng/ml）を誘導したのに対して、ODN2006、およびODN2216のGCコントロール（ggGGGAGCATGCTCgggggG；ODN2243；配列番号150）は、より高い濃度でさえ効果を有さなかった。最大活性には $3 \mu\text{g/ml}$ で到達した。IFN- α の産生は、インキュベーション6時間後に既に検出され得（ 0.2 ng/ml）、そして48時間後にプラトーに到達した。

【0177】

ウイルス感染によるPBMC中の天然インターフェロン産生細胞は、pDC前駆体と同一であり、0.5%未満の頻度である。PBMCは、T細胞、NK細胞および単球の枯渇によって、pDC前駆体について10~70倍富化された(2~18%のCD123⁺⁺pDC; 3~10%のCD11c⁺骨髓性DC(mDC); 50~90%のB細胞; n=4)。pDCの生存性を高めるために、IL-3を全てのサンプルに加えた。この手順の結果、IFN- α 産生が30~60倍増加した(ODN2216で428.3 \pm 56.8 ng/mlまで; n=4; 図7、上パネル、左側)。PBMC中で最も活性のCpG ODNはまた、pDCについて富化されたサンプル中でも最も活性であった。ODN2006、ODN2197またはIL-3単独では、IFN- α をほとんど誘導しなかった(平均値; それぞれ、0.8 ng/ml、0.4 ng/mlおよび0.6 ng/ml、n=4)。二本鎖RNAを模倣しそしてマクロファージ内でIFN- α を誘導することが公知のポリ(I:C)(7 μ g/ml)は、pDCについて富化された細胞においてさらに弱い刺激因子であった(0.3 ng/ml、図面には無し)。大量のIFN- α を誘導した同じCpG ODNはまた、IFN- β 産生も刺激した(2.8 \pm 0.8 ng/mlまで、n=4; 図7、下パネル、左側)。IFN- β が単一のアイソフォームを表すこと、およびIFN- α が少なくとも13種のアイソフォームからなることを考慮すると、かなりの量のIFN- β が産生される。

【0178】

CpG ODNの細胞取り込みが、CpG ODNによるIFN- α およびIFN- β の誘導に重要であるのか否かを決定するために、陽イオン脂質リポフェクチンの効果を試験した(図7、上パネルおよび下パネル、右側)。正に荷電した陽イオン脂質は、負に荷電したODNと複合体を形成し、そしてこれはODNの細胞取り込みを増加する。リポフェクチンは、CpG ODNによって誘導されるIFN- α およびIFN- β の産生を増強した(786 ng/mlまでのIFN- α 、n=3; および9 ng/mlまでのIFN- β 、n=3)。この増加は、試験した全てのCpG ODNで見られたが、ODN1585で最も顕著で

あった(20倍)。

【0179】

(実施例6 CpG ODNで誘導されるIFN- α は、専ら形質細胞様(plasmacytoid)樹状前駆細胞によって産生される)

PBMC内のどの細胞型がCpG ODNに応答してIFN- α を産生するのかを試験するために、フローサイトメリーによって単一の細胞に基づいて細胞内IFN- α の検出を可能にするプロトコルを開発した。PBMCを、3 μ g/mlのODN2216(配列番号7)またはODN2006(配列番号147)と共にインキュベートした。5時間後、細胞を採集し、そしてIFN- α の細胞内染色を実施した。

【0180】

細胞内IFN- α の分析では、インキュベーション期間中にタンパク質分泌を遮断するプレフェルジンAを添加しなかった。PBMCを採集し(約600,000細胞/チューブ)、抗CD123-ビオチン(Pharmingen)と共にインキュベートし、PBS(400g、5分間、4℃)中で洗浄し、そしてストレプトアビジン-APC(Pharmingen)、FITC結合体化抗系譜(anti-lineage)カクテル(抗CD3、抗CD14、抗CD16、抗CD19、抗CD20および抗CD56からなる;Becton Dickinson)、および抗HLA DR-PerCP(Becton Dickinson)で染色した。次に、細胞をPBS中で洗浄し、100 μ lの固定緩衝液A(Fix and Perm Kit, Caltag Laboratories, Burlingame, CA)中に再懸濁し、そして室温で15分間インキュベートした。細胞を2mlのPBS中で再度洗浄し、次いで、100 μ lの浸透性緩衝液B(Fix and Perm Kit)中に再懸濁した。4 μ g/mlのマウス抗ヒトIFN- α mAb(MMHA-11, PBL Biomedical Laboratories)を添加した。PE標識マウスIgG1(MOPC-21, Pharmingen)を、コントロール抗体として使用した。暗所中、室温で15分間のインキュベーション後、細胞を2mlのPBS中で洗浄した。細胞内IFN- α を検出するために、細胞を100 μ lの浸透

性緩衝液B (Fix and Perm Kit) 中に再懸濁し、そして二次抗体としてPE標識ラット抗マウスIg κ 軽鎖 (R8-140, Pharmingen) を用いて染色した。PBS中で洗浄した後、細胞を、2つのレーザー (488nmおよび635nmで励起) を備えたBecton Dickinson FACS Caliburによる4色フローサイトメトリーで分析した。スペクトルのオーバーラップは適切に補償して補正し、そしてアイソタイプのコントロール抗体を使用してゲートを設定した。分析を、形態学的ゲート内の生育可能な細胞で実施した (FSC、SSC、ヨウ化プロピジウム染色で確認した場合に、 $>97\%$ の生育可能な細胞)。データを、CELLQUEST (Becton Dickinson) またはFLOWJOソフトウェア (バージョン2.5.1, Tree Star, Inc., Stanford, CA) を使用して分析した。

【0181】

(結果) 図8Aに示されるように、系譜 $^{+}$ および系譜 $^{-}$ (lin $^{+}$ およびlin $^{-}$) 細胞を、系譜マーカー発現および前方散乱特性によって規定した。ODN 2216で刺激した後、細胞内IFN- α は、潜在的なIFN- α 産生細胞として単球やマクロファージを含むlin $^{+}$ 細胞において検出されなかった (図8C)。主としてpDCやmDCを含むlin $^{-}$ 細胞内では、中間体HLA DR (MHCクラスII) 発現を有する別の集団が、IFN- α について陽性に染色した (図8D)。

【0182】

lin $^{-}$ 集団内では、mDCおよびpDCは、それらのHLA DR/CD123表現型によって区別可能であり得る (図8B)。mDCは、CD123 $^{+/-}$ およびHLA DR $^{++}$ であり (ゲートII) ; pDCは、CD123 $^{++}$ およびHLA DR $^{+}$ である (ゲートIII)。CD123 $^{++}$ /HLA DR $^{-}$ 集団は、好塩基球である。図9Aは、lin $^{-}$ /HLA DR $^{+}$ 細胞内におけるIFN- α の細胞内染色を示す。IFN- α は、ODN2006に応答してではなく、専らODN2216に応答してpDCによって産生された。pDC中で46%が、IFN- α について陽性に染色し、そしてこれは、この特定の染色時点でIFN- α

を産生した0.25%のPBMC内細胞頻度に相当する。他の3つの実験では、ODN2216に応答するIFN- α 産生細胞の頻度は、PBMCの0.08%、0.05%および0.22%であった(pDCの16%、8%および63%)。

【0183】

pDCでの結果とは対照的に、mDCにおいては、IFN- α 合成は、ODN2006またはODN2216による刺激後に全く検出されなかった。

【0184】

従って、pDCは、CpG ODNに応答してIFN- α を産生したPBMC内の唯一の細胞であった。重要なことに、細胞内IFN- α 染色は、プレフェルディンAを用いずに行われた。従って、検出されたIFN- α の量は、数時間にわたるIFN- α の累積量ではなくて、採集時点での実際のIFN- α 産生を表していた。タンパク質分泌を遮断するためにインキュベーション中にプレフェルディンAを加えた(細胞内サイトカイン染色用の標準的なプロトコル)場合、IFN- α 産生細胞を検出することはできなかった。

【0185】

(実施例7 IFN- α 誘導性およびIFN- α 非誘導性CpG ODNは共に、形質細胞様樹状細胞内で初期TNF産生を刺激する。)

pDCは、IL-3に応答してTNF- α を産生し、そしてその結果オートクライン様式でこれら自体の成熟を促進することが報告されている。Hartmann Gら、Antisense Nucleic Acid Drug Dev 6:291-299(1996)。従って、pDC内におけるTNF- α の細胞内蓄積を、異なるCpG ODNに応じて試験した(図9B)。PBMCを、IL-3の非存在下で3 μ g/mlのODN2216(配列番号7)またはODN2006(配列番号147)と共に5時間インキュベートした。プレフェルディンA(1 μ g/ml、Sigma)を、5時間の刺激期間中に加えて、サイトカイン分泌を遮断した。PBMCを採集し(約600,000細胞/チューブ)、抗CD123-ビオチンと共にインキュベートし、PBS(400g、5分間、4℃)中で洗浄し、そしてストレプトアビジン-APC(Pharming

en)、FITC結合体化系統カクテルおよび抗HLA DR-PerCP (Becton Dickinson)で染色した。次いで、細胞を、PBS中で洗浄し、100 μ lの固定緩衝液A (Fix and Perm Kit, Caltag Laboratories, Burlingame, CA)中に再度懸濁し、そして室温で15分間インキュベートした。細胞を、2mlのPBS中で再度洗浄し、そして次いで100 μ lの浸透性緩衝液B (フィックス・アンド・パーム・キット)中に再度懸濁した。5 μ g/mlのPE標識マウス抗ヒトTNF- α mAb (MAb11, Pharmingen)を、初期抗体として加えた。PE標識マウスIgG1 (MOPC-21, Pharmingen)を、コントロール抗体として使用した。暗所中、室温での15分間のインキュベーション後、細胞を、2mlのPBS中で洗浄し、そして次いで上記に記載のようにして4色フローサイトメトリーで分析した。

【0186】

(結果) IFN- α とは対照的に、ODN2006とODN2216に応答するTNF- α 産生pDCの百分率は類似していた(59%対56%)。2つの他の実験は、比較可能な結果(ODN2006およびODN2216での、それぞれ26%対22%および8対6%のTNF- α ⁺ pDC)を示した。1細胞当たりのTNF- α 産生(MFI、平均蛍光強度)は、ODN2006よりODN2216で一定して高かった(図9B)。TNF- α は、mDC内では検出されなかった。系統⁺細胞は、ODN2006またはODN2216のいずれかに応じる顕著な量のTNF- α を産生しなかった。

【0187】

(実施例8 IFN- α 誘導性CpG ODNに応じるpDC上での共刺激分子のアップレギュレーション。)

以前の研究で、ODN2006は、CD4⁺末梢血DC上での共刺激分子の発現を刺激することが報告された。Zhong RKら、J Immunol 163:1354(1999)。pDC上のCD80およびCD86をアップレギュレーションする異なるCpG ODNの能力を試験するために、PBMCを、単球、T細胞およびNK細胞から枯渇し、そして残っている細胞を、IL-3の

存在下で異なるCpG ODNを使用して刺激した。48時間後、CD80およびCD86の発現を、3色フローサイトメトリーによってpDC (CD123⁺⁺/HLA DR⁺) 上で試験した。B細胞 (CD123⁻/HLA DR⁺) およびmDC (CD123^{+/-}/HLA DR⁺⁺) を、分析から除外した。図10に示されているように、pDC上でのCD86の発現を、ODN2006 (配列番号147) 並びにODN1585 (配列番号1) およびODN2216 (配列番号7) によって増大した。ODN1585の効果を、7-デアザグアノシンを用いるポリGテール (ODN2197; 配列番号148) の置換によって消滅させた。非パリンドロームCpG ODN2198 (配列番号149) は、不活性であった。CD80およびHLA DRのアップレギュレーションは、CD86に類似していた。弱いIFN- α 誘導ODN2006に応じるCD80およびCD86の発現の増大は、6時間後に検出可能であった。対照的に、ODN1585およびODN2216は、遅延応答を示し、12時間より遅れて始まった。強いIFN- α 誘導性のCpG ODN (ODN1585、ODN2216) および弱いIFN- α 誘導性のCpG ODN (ODN2006) の両方によって、48時間後にプラトーに到達した。より遅い時点では、フローサイトメトリーによるPBMC中のpDCの同定を、細胞培養中のCD123のダウンレギュレーションによって阻害した。

【0188】

(実施例9 CpG ODNによるIFN- α およびIFN- β 産生の刺激は、形質細胞様樹状細胞に対する直接的な効果であり、そして抗CD4磁気ビーズによって部分的に遮断される。)

CpG ODNが、IFN- α 産生を直接誘導するのかどうかを試験するために、pDC富化PBMCよりむしろ、精製pDCを試験した。PBMCを、単球、T細胞、NK細胞およびB細胞から枯渇した。CD123⁺⁺およびHLA DR⁺ pDCを、残りの細胞集団からFACSでソートして、精製(97%) pDCを得た(図11A)。精製pDC(160,000細胞/ml)を、IL-3の存在下でODN2216 (配列番号7) と共に、または無しでインキュベートした。48時間後、IFN- α およびIFN- β を、上清液中でELISAに

よって測定した。図11Bに示されているように、ODN2216は、IL-3単独(<1.0 pg/ml)と比較して、高レベルのIFN- α (146 ng/ml; 1個のpDC当たり1 pg) およびIFN- β (1 ng/ml) 産生を刺激した。

【0189】

PBMC内およびpDC富化PBMC内では、1個のpDC当たり 4.2 ± 0.8 pgのIFN- α (0.8 U~1.4 U; n=4) が産生された。磁気的標識抗CD4 mAbを使用してpDCを富化した場合、pDCのIFN- α 産生は、はるかにより低かった。これは、CD4-画分がIFN- α を産生しなかったため、CD4-画分内のIFN- α 産生細胞の喪失によるものではなかった。CD4-フラクションをCD4+DCに戻して加えることは、IFN- α 応答を回復しなかったため、CD4-画分内のアクセサリ細胞を介するCpG ODNの二次的な効果を排除した。従って、pDCの表面におけるCD4の架橋化が、活性低下の原因であるように思われた。

【0190】

(実施例10 IFN- α 誘導性CpG ODNは、IFN- α 非誘導性CpG ODNと比較して優れた間接的なNK細胞の活性化を提供する。)

大量のIFN- α を誘導するCpG ODNはまた、NK細胞のより高い活性化を示すかどうかを試験するために、PBMCを、異なるCpG ODNと共にインキュベートした。NK細胞の活性化を、CD69発現(FACS)に関連してそしてインビトロNK細胞溶解活性によって測定した。NK細胞溶解活性を測定するために、PBMCを、異なる濃度の種々のODNと共にインキュベートした。18時間後、細胞を採集し、そしてK562標的細胞に対する標準的な4時間⁵¹Cr放出アッセイにおいて、エフェクター細胞として、以前に記載されたようにして使用した。Hartmann Gら、Gene Therapy 6: 893 (1999)。陽性コントロールは、組換えIL-2 (100 IU/ml)を含んでおり、そして陰性コントロールは培地だけを含んでいた。結果は比溶解%として表される: 比溶解(%) = ((実験のカウント-自然発生的放出カウント) / (最大放出カウント-自然発生的放出カウント)) × 100%。

【0191】

(結果) IFN- α 誘導性のODN2216およびODN1585は、刺激因子を有していないコントロール ($8 \pm 2\%$; $n=5$) と比較して、24時間以内にCD69陽性 (活性化の初期マーカー) NK細胞のパーセントを高めた (ODN2216で $38 \pm 12\%$; $n=5$)。ODN2006はより低い応答を示した ($19\% \pm 6\%$)。PBMCを、CpG ODNと共にインキュベートした場合、CD69発現の増加と一致して、K562細胞のNK細胞媒介溶解は顕著に高くなった。0.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の低濃度でさえ、ODN2216 (配列番号7) は、NK細胞溶解活性を刺激するのに依然としてIL-2 (100 IU/ml) と同程度に有効であった (図12)。ODN1585 (配列番号1) およびODN2006 (配列番号147) はより有効でなかった。より高濃度 (6 $\mu\text{g}/\text{ml}$) でさえ、ODN1585のGCコントロール (5' ggGGTCAAGCTTGAgggggG3'; ODN2118; 配列番号151) は、培地単独と比較して完全に不活性であった (図12)。精製NK細胞をCpG ODNと共にインキュベートする場合、CD69発現およびK562細胞の溶解は、増加せず、NK細胞に対するCpG ODNの間接的な効果が示された。

【0192】

(実施例11 CpGオリゴヌクレオチドは、IPCによって大量のIL-8産生を誘導する。)

IL-8は、他の免疫細胞を誘引するケモカインである。IL-3内で増殖したIPCはIL-8を産生しないが、一方CpGオリゴヌクレオチドはIPCによって大量のIL-8産生を刺激する (平均23 ng/ml、図13)。

【0193】

新たに調製されたIPC (実施例1を参照のこと、最終濃度1 ml当たり $2 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 個の細胞) を、10 ng/mlのIL-3を補充した完全培地中で2日間培養した。1組の平行培養物に10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のポリICを補充し、そして別の1組の平行培養物には6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のCpG ODN2006 (配列番号147) を補充した。上清液は、ヒトIL-8に特異的なELISA (R&D Systems、ミネソタ州ミネアポリス) を使用して、供給者の指示に従

ってIL-8について分析した。

【0194】

(結果) 3人の異なるドナーから得られた代表的なデータは図13に示す。IPCによるIL-8分泌は、IL-3を含有している完全培地にCpGオリゴヌクレオチドを添加することによって強く誘導された。対照的に、この培地へのポリICの添加は、効果を有していなかった。この結果は、CpGオリゴヌクレオチドがIPCを誘導して大量のIL-8を産生させることを示している。

【0195】

(実施例12 I型IFNは、 $\gamma\delta$ T細胞の活性化および増殖を誘導する。)

$\gamma\delta$ T細胞(V γ 9/V δ 2)は、通常の前ペプチド性リン抗原に応答する前活性化段階の抗原特異的T細胞である。これらの抗原への $\gamma\delta$ T細胞の暴露は、APCの非存在下でIFN- γ 産生を刺激する。 $\gamma\delta$ T細胞活性化を試験するために、健康なドナーから得られたPBMC (2×10^6 /ml)を、15 μ Mのイソペンテニルピロホスフェート(IPP、V γ 9/V δ 2細胞に対して特異的なリン抗原)の存在下または非存在下で6 μ g/mlのCpG ODN (2006、1585または2216)もしくは培地単独と共に3日間刺激した。プレフェルディンAは最後の4時間に加えた。V γ 9 TCRおよびCD3を表面染色した後、細胞を固定し、浸透性にし、そしてIFN- γ に対するmAbで染色した。3色フローサイトメトリーにおいて、 $\gamma\delta$ T細胞を、これらのFSC/SSCプロファイル、CD3およびTCR V γ 9発現を使用してゲートし、そしてIFN- γ 発現について分析した。異なるドナーから得られた結果を比較するために、データを、培地またはIPPコントロールと比較したx倍増加として先ず計算し、そしてその後、それぞれ、培地およびIPPの平均値を掛けた。14人と20人との間のドナーを、各CpG ODNについて分析した。データを、平均値+SEMとして表し；* ($p < 0.01$) および** ($p < 0.001$) は、培地コントロールをCpG ODNおよびIPP単独をIPP+CpG ODNと比較する、組み合わされたサンプルについてスチューデントのt検定で計算したp値を示す。

【0196】

$\gamma\delta$ T細胞増殖を試験するために、健康なドナーから得られたPBMCを、異なるCpG ODN (2006、1585または2216、各々6 μ g/ml) の存在下または非存在下でIPP (30 μ M) を用いて刺激した。 $\gamma\delta$ TCR陽性細胞の拡張を、抗V γ 9抗体を使用してフローサイトメトリーで評価し、そして生育可能なPBMC内のTCR V γ 9陽性細胞%として示される。9人と16人との間のドナーを各ODNについて分析した。データはIPP単独と比較したx倍増加として示される(平均値+SEM) ; *は<0.05を示す(IPP対IPP+CpG ODN)。

【0197】

(結果) PBMC内で、 $\gamma\delta$ T細胞とNK細胞は共にCpG ODNに応答してCD69発現、IFN- γ およびTNF- α 産生、パーフォリン含有量および溶解活性を高めたが、 $\alpha\beta$ T細胞は応答しなかった。IPPと組み合わせたCpG ODNは $\gamma\delta$ T細胞におけるIFN- γ (図14) およびパーフォリンの産生を相乗的に誘導した。この相乗効果はODN2006よりODN2216および1585、すなわち、I型IFNの強力なインデューサーであるODNにより顕著であった。精製された $\gamma\delta$ T細胞またはNK細胞では、CpG ODNは活性を全く示さないか、またはIPPで刺激される活性を低下さえさせた。

【0198】

さらに、CpG ODNはIPPに対する $\gamma\delta$ T細胞の増殖応答を相乗的に高めた(図15)。図15Aは、1つの代表的な実験から得られる $\gamma\delta$ T細胞拡張の動力学を示す。図15Bは、IPP単独または異なるCpG ODNと組み合わせたIPPによる刺激から10日後の $\gamma\delta$ T細胞の拡張を示す。

【0199】

組換え体IFN- α/β またはIL-12の添加はPBMC内におけるCpG ODNの刺激効果を模擬している。機能的なIL12p70は、CpG ODNで刺激したPBMCの上清液中では検出することができなかった。CpG ODNが $\gamma\delta$ T細胞およびNK細胞を活性化する潜在能力は、IFN- α/β を誘導する能力と良好に相関していた。IFN- α/β タンパク質の中和抗体および対応するレセプターの組合せによるIFN- α/β 機能の遮断は、 $\gamma\delta$ T細胞お

およびNK細胞のCpG ODN誘導による活性化を阻害した。IL-12の中和抗体またはIL-18結合タンパク質の添加は、基線IFN- γ を減少したが、CpG ODN刺激によるIFN- γ を減少しなかった。TNF- α 、IL-1 β またはIL-15の中和は効果を全く示さなかった。結論すると、これらの結果によって、(i) IFN- α/β は $\gamma\delta$ T細胞の強力なアクチベーターであり；(ii) CpG ODNは、IFN- α/β の誘導によって、 $\gamma\delta$ T細胞およびNK細胞を活性化し；(iii) I型IFNの強力なインデューサーであるCpG ODNは、 $\gamma\delta$ T細胞およびNK細胞を活性化するように、I型IFNの強力なインデューサーでないODNより強力であり；(iv) CpG ODNは、 $\gamma\delta$ T細胞内の抗原特異的T細胞応答を共刺激し；そして(v) CpG ODNで誘導される $\gamma\delta$ T細胞およびNK細胞の非特異的な活性化はTh1応答を促進する初期IFN- γ を提供することが示された。

【0200】

(実施例13 I型IFN誘導ISNAは、IL-12産生を阻害する。)

IFN- β はIL-12産生をダウンレギュレーションすると記載されている。従って、IL-12産生に対するI型IFN誘導およびI型IFN非誘導ISNAの効果を以下ようにして試験した。健康なドナー由来のPBMC (2×10^6 /ml) は、IL-4 (100 U/ml)、GM-CSF (10 U/ml) およびIFN- γ (10 ng/ml) の存在下で25 μ g/mlの刺激性抗CD40抗体で刺激した。培地、6 μ g/mlのODN2006 (配列番号147)、6 μ g/mlのODN1585 (配列番号1)、または5000 U/mlの組換え体IFN- α と500 U/mlのIFN- β の組合せ物のいずれかを加えた。48時間後、IL12p70を上清液中でELISAによって測定した。データは、抗CD40単独によるIL12p70産生 (平均値=143 pg/ml) のx倍として示し、そして3人の異なるドナーの平均値 (+SEM) を表す。

【0201】

(結果) 図16は抗CD40と組み合わせたODN1585が、抗CD40コントロールと比較して、組換え体IFN- α および組換え体IFN- β の添加による阻害と同様な程度IL12p70産生を阻害したことを示している。対照

的に、抗CD40と組み合わせたODN2006は抗CD40陽性コントロールを超えてIL12p70産生を高めた。これらの結果は、PBMCにおいて、I型IFNを誘導するISNAはIL-12p70の産生を抑制し得、そして反対に、I型IFNを誘導しないISNAはIL-12p70の産生を高め得ることを示している。

【0202】

定量的な実時間PCRによるmRNAレベルの分析は、I型IFNを誘導しないISNAによるIL-12p40およびIL-12p35 mRNAの少数ではあるが等しいコピー数の誘導を明らかにした。対照的に、I型IFNを誘導するISNAはIL-12p35 mRNAのより多数のコピーを誘導したが、IL-12p40 mRNAを検出することはできなかった。I型IFNを誘導しないISNAはIL-12p70合成を高め(170%)、そしてI型IFNを誘導するISNAはIL-12p70合成を遮断した(25%)。IL-12p70の阻害は組換え体IFN- β で模擬することができ得る。IFN- α/β タンパク質の中和抗体とレセプターの組合せはIL-12p70のI型IFN誘導ISNA媒介阻害を反転させた。これらの結果は、I型IFNの強力なインデューサーであるCpG ODNが、IL-12p40 mRNA産生に対するIFN- α/β 媒介負フィードバックメカニズムによってCD40依存性IL-12p70産生を抑制することを示している。従って、T細胞と抗原提示細胞のCD40Lを介した相互作用は、IL-12(I型IFNを誘導しないISNA)またはIFN- α/β (I型IFNを誘導するISNA)によって支配されるサイトカイン環境を導く。I型IFNを誘導しないISNAはナイーブT細胞をプライミングするのに優れて得、そしてI型IFNを誘導するISNAは前活性化されているメモリーT細胞を支持するのにより高い活性を有し得るが、これらは共にTh1応答を促進する。

【0203】

(実施例14 一次およびリコールペプチド特異的ヒトCTL応答に対するCpG ODNの効果。)

HLA A2陽性の健康なドナーから得られたCD8+T細胞(1×10^6)

は、 $6\mu\text{g/ml}$ のCpG ODN2006（配列番号147）、1585（配列番号1）または2216（配列番号7）の存在下または非存在下、インフルエンザマトリックスタンパク質から誘導されるHLA A2制限ペプチド（GILGFVFTL）またはメランA（melan A）／マートー1（mart-1）タンパク質から誘導されるペプチド（ELAGIGILT V）のどちらかを用いて24ウェルプレート中で刺激した。自己由来PBMC（ 3×10^6 ）をAPCとして使用した。14日後、細胞を採集し、洗浄し、そしてインフルエンザマトリックスまたはメランAペプチドで6時間再度刺激した。ブレフェルディンAは最後の4時間に加えた。細胞はCD8およびCD3について染色し、引き続いて固定し、浸透性にし、そしてIFN- γ に対するmAbで染色した。14日後にはまた、四量体陽性CD8⁺T細胞（HLA-A2／メランAペプチドおよびHLA-A2／インフルエンザマトリックスペプチド）の百分率を、フローサイトメトリーで測定した。四量体は、ペプチド特異的T細胞レセプターと特異的に結合し、そしてフローサイトメトリーを使用してペプチド特異的T細胞を同定できるように設計されている蛍光色素標識MHC-ペプチド四量体である。Altman JDら、Science 274:94-96（1996）；米国特許第5,635,363号。

【0204】

（結果） 3色フローサイトメトリーでは、CD8⁺T細胞（CTL）をIFN- γ 発現について分析した。結果は図17Aおよび17Cに、全CD8⁺T細胞のIFN- γ 陽性細胞％として表されている。ペプチド特異性は、HIV p o lから誘導された無関係のHLA A2ペプチドで刺激して試験し、そして全てのサンプルで<0.2％であった。7人のドナーから得られたデータは、平均値+SEMとして表されている。これらの結果は、より少ないリコールCTLを誘導しそして一次CTLの発生に効果を有していなかったかまたは阻害さえしたODN1585およびODN2216とは対照的に、ODN2006が、メランA／マートー1ペプチドおよびインフルエンザペプチドに対する一次およびリコールCTL応答を共にそれぞれ高めたことを示している。

【0205】

MHC-四量体染色を使用する抗原特異的CTLの定量から得られた結果は、それぞれ図17Bおよび17DでインフルエンザペプチドおよびメランA/マート-1ペプチドに対して示されている。7人のドナーから得られたデータは、平均値+SEMとして表されている；*は、組み合わせられたサンプルについてチューデントのt検定（培地をCpG ODNによる刺激と比較）によって計算された <0.05 のp値を示す。

【0206】

（実施例15 「高応答者」におけるIFN- α 分泌）

12人の異なるドナーから得られたPBMCは、ODN2336（配列番号37）、ODN2334（配列番号36）、ODN2295（配列番号20）、ODN2255（配列番号16）、ODN2247（配列番号11）、ODN2216（配列番号7）およびODN2006（配列番号147）を含んでいるパネルODNから選択した種々の濃度のODNと共にインキュベートした。この試験から得られた結果は、6人の血液ドナーの細胞は選択したODNとのインキュベーション後に500pg/mlより多く（7000pg/mlまで）のIFN- α を分泌したので、これらのドナーの内6人は「高応答者」として分類され得ることを示していた。残りの6人のドナーの細胞が10と500pg/mlとの間の量のIFN- α しか分泌しなかったので、「高」応答者と「低」応答者との間を識別し得た。これらの異なる結果に対する1つの理由は、少なくとも24時間齢の軟膜を使用したことから生じて得る。IFN- α を分泌する主要な細胞型であるpDCは細胞培養物中に約3日間しか生存しないので、少なくとも24時間齢の軟膜から得られたPBMCは非常に少数のこの細胞型を含有し得る。

【0207】

IFN- α は、IFN- α の全サブタイプを認識するイライザキットを使用して上記実験で測定した。対照的に、他の大部分のイライザキットはIFN- α 2Bしか測定しない。従って、IFN- α 2Bの量は、異なるIFN- α サブタイプの誘導において起こり得る差異に関する情報を得るために、幾つかの実験で全てのIFN- α サブタイプと比較した。加えて、IFN- α の量をIFN- γ と比較した。この試験の結果に基づいて、IFN- α 2B誘導と全IFN- α サブ

タイプの誘導との間には相関関係が存在していた。しかしながら、対照的に、IFN- α とIFN- γ 間には明確な相関関係は存在していなかった。

【0208】

(実施例16 選択したCpG ODNによるIFN- α 分泌の誘導)

単一ドナーから得られたヒトPBMCは、単球、NK細胞およびT細胞を枯渇させ、主としてB細胞、RBCおよびDCを残すミルテニイ (Miltenyi) DC単離キットの第1工程を通過させてDCを富化した。次いで、これらをIL-3 (10 ng/ml) および6 μ g/mlの種々のODN: ODN1585 (配列番号1)、ODN2022 (配列番号2)、ODN2118 (配列番号151)、ODN2184 (配列番号3)、ODN2185 (配列番号4)、ODN2192 (配列番号5)、ODN2197 (配列番号148)、ODN2198 (配列番号149)、ODN2204 (配列番号6)、ODN2216 (配列番号7) またはODN2217 (配列番号8) の存在下で2日間インキュベートした。平行サンプルにおいて、IFN- γ を1000 U/mlで加えた。上清液を集め、そしてIFN- α に特異的なELISAで分析した。

【0209】

(結果) ODNは種々の程度にIFN- α を誘導し、その際IFN- γ の添加によって幾らか増大した。ODNのうち幾つかは、IFN- γ を添加しなかった場合でさえ、IFN- α を例外的な程度 (>50,000 pg/ml) に誘導した。

【0210】

(実施例17 ドナーおよび種々のODNに対するIFN- α 応答の配列依存性。)

4人の異なるドナーから取得したPBMCを、0.1 μ g/mlの多様なODNと共に2日間インキュベートした。このODNパネルには以下:

【0211】

【化21】

ggGGTCAACGTTGAgggggG	ODN 1585	配列番号1
ggggcgcgttttgggggg	ODN 2184	配列番号3
tcgtcgtttgtcgtttgggggg	ODN 2185	配列番号4
ggggcgcgcgtcgggggg	ODN 2192	配列番号5
gmGGTCAACGTTGAgggmggG	ODN 2197	配列番号148
ggGGAGTTCGTTGAgggggG	ODN 2198	配列番号149
ggggcatcgaagggggg	ODN 2204	配列番号6
ggGGGACGATCGTCgggggG	ODN 2216	配列番号7
gggggtcgtacgacgggggg	ODN 2217	配列番号8
ggggacgtcgcgtgggggg	ODN 2229	配列番号152
gggggtcgtcgaacgagggggg	ODN 2237	配列番号153
ggggacgtcgaacgtgggggg	ODN 2238	配列番号154
ggGGGAGCATGCTGgggggG	ODN 2243	配列番号155
ggGGGACGATATCGTCgggggG	ODN 2245	配列番号9
ggGGGACGACGTCGTCgggggG	ODN 2246	配列番号10
ggGGGACGAGCTCGTCgggggG	ODN 2247	配列番号11
ggGGGACGTACGTCgggggG	ODN 2248	配列番号12
ggGGGACGATCGTTGggggG	ODN 2252	配列番号13
ggGGAACGATCGTCgggggG	ODN 2253	配列番号14
ggGGGACGATCGTCgggggG	ODN 2254	配列番号15
ggGGGACGATCGTCgggggG	ODN 2255	配列番号16
ggGGGTCATCGATGAgggggG	ODN 2260	配列番号17
ggGGGTCAACGTTGAgggggG	ODN 2261	配列番号156
ggGGTCGTCGACGAgggggG	ODN 2293	配列番号18
ggGGTCGTTTCAACGAgggggG	ODN 2294	配列番号19
ggGGACGTTTCAACGTgggggG	ODN 2295	配列番号20
ggGGAACGACGTCGTTgggggG	ODN 2297	配列番号21
ggGGAACGTACGTCgggggG	ODN 2298	配列番号22
ggGGAACGTACGTACGTTgggggG	ODN 2299	配列番号23
ggGGTCACCGGTGAgggggG	ODN 2300	配列番号24
ggGGTCGACGTACGTGGAgggggG	ODN 2301	配列番号25
ggGGACCGGTACCGGTgggggG	ODN 2302	配列番号26
ggGTCGACGTGGAgggggG	ODN 2303	配列番号27
ggGGTCGACGTGGAgggggG	ODN 2304	配列番号28
ggGGAACGTTAACGTTgggggG	ODN 2305	配列番号29
ggGGACGTGACGTgggggG	ODN 2306	配列番号30
ggGGGTCGTTTCGTTgggggG	ODN 2311	配列番号31
ggGGGATGATTGTTgggggG	ODN 2312	配列番号157
ggGGGAZGATZGTTgggggG	ODN 2313	配列番号158
ggGGGAGCTAGCTTgggggG	ODN 2314	配列番号159
ggGACGATCGTCGgggggG	ODN 2328	配列番号32
ggGTCGTCGACGAgggggG	ODN 2329	配列番号33
ggGTCGTCGACGAgggggG	ODN 2330	配列番号34
ggGTCGTCGTCGTCgggggG	ODN 2331	配列番号160
ggGGACGATCGTCGgggggG	ODN 2332	配列番号35
ggGGACGTGTCGTCgggggG	ODN 2333	配列番号161
ggGGTCGACGTGACGTGGAgggggG	ODN 2334	配列番号36
ggGGAACCGCGTTgggggG	ODN 2335	配列番号162

(CD 2313 の Z は、5-メチルシトシンを意味する)

が含まれていた。上清液を集めそしてIFN- α についてELISAでアッセイした。1組の平行実験では、同じ4人のドナーから取得したPBMCを $1\mu\text{g}/\text{ml}$ のODNの女性パネルと共に2日間インキュベートした。

【0212】

(結果) 4人のドナー由来および $0.1\mu\text{g}/\text{ml}$ のODNと共にインキュベートしたPBMCの結果および再び $1\mu\text{g}/\text{ml}$ のODNと共にインキュベ

トしたPBMCの結果は、用量およびドナー変動を示し、その際幾つかのODNはIFN- α を少なくとも5000 pg/mlのレベルに誘導しそしていくつかのODNはINF- α を5000 pg/mlを優に超えるレベルに誘導した。

【0213】

当業者は、日常的な実験手法以外を使用しないで、本明細書に記載されている本発明の特定の実施形態に対する多数の等価物を認識するか、または確認し得る。このような等価物は以下の特許請求の範囲に包含されるように意図されている。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Coley Pharmaceutical Group, Inc.
University of Iowa Research Foundation

<120> Methods Related to Immunostimulatory
Nucleic Acid-Induced Interferon

<130> C1039/7044WO

<150> 60/156,147

<151> 1999-09-29

<160> 165

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<221> misc_feature

<222> (1)...(2)

<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<221> misc_feature

<222> (3)...(14)

<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<221> misc_feature

<222> (15)...(19)

<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<221> misc_feature

<222> (20)...(20)

<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<400> 1

ggggtcaacg ttgagggggg

20

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<221> misc_feature

<222> (1)...(24)

<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<400> 2

```

tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt      24
    <210> 3
    <211> 20
    <212> DNA
    <213> Artificial Sequence

    <220>
    <223> Synthetic Oligonucleotide

    <221> misc_feature
    <222> (1)...(20)
    <223> Backbone has phosphorothioate linkages.

    <400> 3
ggggtcgtcg ttttggggg          20
    <210> 4
    <211> 24
    <212> DNA
    <213> Artificial Sequence

    <220>
    <223> Synthetic Oligonucleotide

    <221> misc_feature
    <222> (1)...(24)
    <223> Backbone has phosphorothioate linkages.

    <400> 4
tcgtcgtttt gtcgttttgg gggg    24
    <210> 5
    <211> 20
    <212> DNA
    <213> Artificial Sequence

    <220>
    <223> Synthetic Oligonucleotide

    <221> misc_feature
    <222> (1)...(20)
    <223> Backbone has phosphorothioate linkages.

    <400> 5
ggggtcgacg tcgagggggg        20
    <210> 6
    <211> 20
    <212> DNA
    <213> Artificial Sequence

    <220>
    <223> Synthetic Oligonucleotide

    <221> misc_feature
    <222> (1)...(20)
    <223> Backbone has phosphorothioate linkages.

    <400> 6

```

gggggtcatcg atgagggggg

20

<210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide

 <221> misc_feature
 <222> (1)...(2)
 <223> Backbone has phosphorothioate linkages.

 <221> misc_feature
 <222> (3)...(14)
 <223> Backbone has phosphodiester linkages.

 <221> misc_feature
 <222> (15)...(19)
 <223> Backbone has phosphorothioate linkages.

 <221> misc_feature
 <222> (20)...(20)
 <223> Backbone has phosphodiester linkages.

<400> 7
 gggggacgat cgtcggggg

20

<210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide

 <221> misc_feature
 <222> (1)...(20)
 <223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<400> 8
 gggggtcgta cgacggggg

20

<210> 9
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide

 <221> misc_feature
 <222> (1)...(2)
 <223> Backbone has phosphorothioate linkages.

 <221> misc_feature
 <222> (3)...(16)
 <223> Backbone has phosphodiester linkages.

```

<221> misc_feature
<222> (17)...(21)
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<221> misc_feature
<222> (22)...(22)
<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<400> 9
gggggacgat atcgtcgggg gg                22

<210> 10
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Oligonucleotide

<221> misc_feature
<222> (1)...(2)
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<221> misc_feature
<222> (3)...(16)
<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<221> misc_feature
<222> (17)...(21)
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<221> misc_feature
<222> (22)...(22)
<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<400> 10
gggggacgac gtcgtcgggg gg                22

<210> 11
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Oligonucleotide

<221> misc_feature
<222> (1)...(2)
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<221> misc_feature
<222> (3)...(16)
<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<221> misc_feature
<222> (17)...(21)
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<221> misc_feature
<222> (22)...(22)

```

```

<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<400> 11
gggggacgag ctcgtcgggg gg 22

<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Oligonucleotide

<221> misc_feature
<222> (1)...(2)
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<221> misc_feature
<222> (3)...(14)
<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<221> misc_feature
<222> (15)...(19)
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<221> misc_feature
<222> (20)...(20)
<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<400> 12
gggggacgta cgtcgggggg 20

<210> 13
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Oligonucleotide

<221> misc_feature
<222> (1)...(2)
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<221> misc_feature
<222> (3)...(15)
<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<221> misc_feature
<222> (16)...(19)
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<221> misc_feature
<222> (20)...(20)
<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<400> 13
gggggacgat cgttgggggg 20

<210> 14

```

```

<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Oligonucleotide

<221> misc_feature
<222> (1)...(2)
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<221> misc_feature
<222> (3)...(15)
<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<221> misc_feature
<222> (16)...(19)
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<221> misc_feature
<222> (20)...(20)
<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<400> 14
ggggaacgat cgtcgggggg                                     20

<210> 15
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Oligonucleotide

<221> misc_feature
<222> (1)...(2)
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<221> misc_feature
<222> (3)...(15)
<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<221> misc_feature
<222> (16)...(20)
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<221> misc_feature
<222> (21)...(21)
<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<400> 15
gggggggacga tcgtcggggg g                                     21

<210> 16
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Oligonucleotide

```

```

<221> misc_feature
<222> (1)...(2)
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<221> misc_feature
<222> (3)...(15)
<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<221> misc_feature
<222> (16)...(20)
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<221> misc_feature
<222> (21)...(21)
<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<400> 16
gggggacgat cgtcgggggg g                                21

<210> 17
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Oligonucleotide

<221> misc_feature
<222> (1)...(2)
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<221> misc_feature
<222> (3)...(15)
<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<221> misc_feature
<222> (16)...(20)
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<221> misc_feature
<222> (21)...(21)
<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<400> 17
gggggtcatc gatgaggggg g                                21

<210> 18
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Oligonucleotide

<221> misc_feature
<222> (1)...(2)
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<221> misc_feature

```

```

<222> (3)...(14)
<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<221> misc_feature
<222> (15)...(19)
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<221> misc_feature
<222> (20)...(20)
<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<400> 18
ggggtcgtcg acgagggggg 20

<210> 19
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Oligonucleotide

<221> misc_feature
<222> (1)...(2)
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<221> misc_feature
<222> (3)...(16)
<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<221> misc_feature
<222> (17)...(21)
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<221> misc_feature
<222> (22)...(22)
<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<400> 19
ggggtcgttc gaacgagggg gg 22

<210> 20
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Oligonucleotide

<221> misc_feature
<222> (1)...(2)
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<221> misc_feature
<222> (3)...(16)
<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<221> misc_feature
<222> (17)...(21)
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

```

```

<221> misc_feature
<222> (22)...(22)
<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<400> 20
ggggacgttc gaacgtgggg gg                22

<210> 21
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Oligonucleotide

<221> misc_feature
<222> (1)...(2)
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<221> misc_feature
<222> (3)...(16)
<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<221> misc_feature
<222> (17)...(21)
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<221> misc_feature
<222> (22)...(22)
<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<400> 21
ggggaacgac gtcgttgggg gg                22

<210> 22
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Oligonucleotide

<221> misc_feature
<222> (1)...(2)
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<221> misc_feature
<222> (3)...(14)
<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<221> misc_feature
<222> (15)...(19)
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<221> misc_feature
<222> (20)...(20)
<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<400> 22

```

```

ggggaacgta cgtcggggg          20
    <210> 23
    <211> 24
    <212> DNA
    <213> Artificial Sequence

    <220>
    <223> Synthetic Oligonucleotide

    <221> misc_feature
    <222> (1)...(2)
    <223> Backbone has phosphorothioate linkages.

    <221> misc_feature
    <222> (3)...(18)
    <223> Backbone has phosphodiester linkages.

    <221> misc_feature
    <222> (19)...(23)
    <223> Backbone has phosphorothioate linkages.

    <221> misc_feature
    <222> (24)...(24)
    <223> Backbone has phosphodiester linkages.

    <400> 23
ggggaacgta cgtacgttg gggg          24
    <210> 24
    <211> 20
    <212> DNA
    <213> Artificial Sequence

    <220>
    <223> Synthetic Oligonucleotide

    <221> misc_feature
    <222> (1)...(2)
    <223> Backbone has phosphorothioate linkages.

    <221> misc_feature
    <222> (3)...(14)
    <223> Backbone has phosphodiester linkages.

    <221> misc_feature
    <222> (15)...(19)
    <223> Backbone has phosphorothioate linkages.

    <221> misc_feature
    <222> (20)...(20)
    <223> Backbone has phosphodiester linkages.

    <400> 24
ggggtcaccg gtgaggggg          20
    <210> 25
    <211> 24
    <212> DNA
    <213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> Synthetic Oligonucleotide

<221> misc_feature
<222> (1)...(2)
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<221> misc_feature
<222> (3)...(18)
<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<221> misc_feature
<222> (19)...(23)
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<221> misc_feature
<222> (24)...(24)
<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<400> 25
ggggtcgacg tacgtcgagg gggg                24

<210> 26
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Oligonucleotide

<221> misc_feature
<222> (1)...(2)
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<221> misc_feature
<222> (3)...(16)
<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<221> misc_feature
<222> (17)...(21)
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<221> misc_feature
<222> (22)...(22)
<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<400> 26
ggggaccggt accggtgggg gg                22

<210> 27
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Oligonucleotide

<221> misc_feature
<222> (1)...(2)

```

```

<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<221> misc_feature
<222> (3)...(13)
<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<221> misc_feature
<222> (14)...(18)
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<221> misc_feature
<222> (19)...(19)
<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<400> 27
gggtcgacgt cgagggggg 19

<210> 28
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Oligonucleotide

<221> misc_feature
<222> (1)...(2)
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<221> misc_feature
<222> (3)...(13)
<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<221> misc_feature
<222> (14)...(18)
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<400> 28
ggggtcgacg tcgagggg 18

<210> 29
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Oligonucleotide

<221> misc_feature
<222> (1)...(2)
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<221> misc_feature
<222> (3)...(16)
<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<221> misc_feature
<222> (17)...(21)
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

```

```

<221> misc_feature
<222> (22)...(22)
<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<400> 29
ggggaacgtt aacgttgggg gg                                22

<210> 30
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Oligonucleotide

<221> misc_feature
<222> (1)...(2)
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<221> misc_feature
<222> (3)...(14)
<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<221> misc_feature
<222> (15)...(18)
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<221> misc_feature
<222> (19)...(19)
<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<400> 30
ggggacgtcg acgtggggg                                19

<210> 31
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Oligonucleotide

<221> misc_feature
<222> (1)...(2)
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<221> misc_feature
<222> (3)...(14)
<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<221> misc_feature
<222> (15)...(19)
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<221> misc_feature
<222> (20)...(20)
<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<400> 31
gggggtcggt cggtggggg                                20

```

```

<210> 32
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Oligonucleotide

<221> misc_feature
<222> (1)...(2)
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<221> misc_feature
<222> (3)...(13)
<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<221> misc_feature
<222> (14)...(18)
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<221> misc_feature
<222> (19)...(19)
<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<400> 32
gggacgatcg tcggggggg                                     19

<210> 33
<211> 20
<212> DNA
<213> 'Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Oligonucleotide

<221> misc_feature
<222> (1)...(2)
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<221> misc_feature
<222> (3)...(13)
<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<221> misc_feature
<222> (14)...(19)
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<221> misc_feature
<222> (20)...(20)
<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<400> 33
gggtcgtcga cgagggggg                                     20

<210> 34
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> Synthetic Oligonucleotide

<221> misc_feature
<222> {1}...{2}
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<221> misc_feature
<222> {3}...{13}
<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<221> misc_feature
<222> {14}...{18}
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<221> misc_feature
<222> {19}...{19}
<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<400> 34
ggtcgtcgac gagggggggg                                19

<210> 35
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Oligonucleotide

<221> misc_feature
<222> {1}...{2}
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<221> misc_feature
<222> {3}...{14}
<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<221> misc_feature
<222> {15}...{19}
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<221> misc_feature
<222> {20}...{20}
<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<400> 35
ggggacgatac gtcggggggg                                20

<210> 36
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Oligonucleotide

<221> misc_feature
<222> {1}...{2}
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

```

```

<221> misc_feature
<222> (3)...(21)
<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<221> misc_feature
<222> (22)...(26)
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<221> misc_feature
<222> (27)...(27)
<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<400> 36
ggggtcgacg tcgacgtcga gggggggg          27

<210> 37
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Oligonucleotide

<221> misc_feature
<222> (1)...(2)
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<221> misc_feature
<222> (3)...(15)
<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<221> misc_feature
<222> (16)...(20)
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<221> misc_feature
<222> (21)...(21)
<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<400> 37
ggggacgacg tcgtgggggg g          21

<210> 38
<211> 8
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 38
aacgttct          8

<210> 39
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

```

<223> Synthetic	Oligonucleotide	
<400> 39		
accatggacg aactgtttcc cctc		24
<210> 40		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Synthetic Oligonucleotide		
<400> 40		
accatggacg acctgtttcc cctc		24
<210> 41		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Synthetic Oligonucleotide		
<400> 41		
accatggacg agctgtttcc cctc		24
<210> 42		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Synthetic Oligonucleotide		
<400> 42		
accatggacg atctgtttcc cctc		24
<210> 43		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Synthetic Oligonucleotide		
<400> 43		
accatggacg gtctgtttcc cctc		24
<210> 44		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Synthetic Oligonucleotide		
<400> 44		
accatggacg tactgtttcc cctc		24

<210> 45
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide

 <400> 45
 accatggacg ttctgtttcc cctc 24

 <210> 46
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide

 <400> 46
 agctatgacg ttccaagg 18

 <210> 47
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide

 <400> 47
 ataggaggtc caacgttctc 20

 <210> 48
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide

 <400> 48
 atcgactctc gaacgttctc 20

 <210> 49
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide

 <400> 49
 atcgactctc gacggttctc 20

 <210> 50
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide
 <400> 50
 atgacgttcc tgacgtt 17
 <210> 51
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide
 <400> 51
 atggaagggtc caacgttctc 20
 <210> 52
 <211> 0
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide
 <400> 52
 ATGGAAGGTCCAGCGTTCTC
 <210> 53
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide
 <400> 53
 atggactctc cagcgttctc 20
 <210> 54
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide
 <400> 54
 atggaggctc catcgttctc 20
 <210> 55
 <211> 7
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide
 <400> 55
 caacgtt 7

<210> 56	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic Oligonucleotide	
<400> 56	
cacgttgagg ggcac	15
<210> 57	
<211> 8	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic Oligonucleotide	
<400> 57	
ccaacgtt	8
<210> 58	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic Oligonucleotide	
<400> 58	
gagaacgatg gaccttccat	20
<210> 59	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic Oligonucleotide	
<400> 59	
gagaacgctc cagcactgat	20
<210> 60	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic Oligonucleotide	
<400> 60	
gagaacgctc gaccttccat	20
<210> 61	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide
 <400> 61
 gagaacgctc gaccttcgat 20
 <210> 62
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide
 <400> 62
 gagaacgctg gaccttccat 20
 <210> 63
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide
 <400> 63
 gcatgacgtt gagct 15
 <210> 64
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide
 <400> 64
 gcgtgcgttg tcgttgctgt t 21
 <210> 65
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide
 <400> 65
 gctagacgtt agcgt 15
 <210> 66
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide
 <400> 66
 gctagacgtt agtgt 15

<210> 67
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide

 <400> 67
 gctagatggt agcgt 15

 <210> 68
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide

 <400> 68
 ggggtcaacg ttgacggg 19

 <210> 69
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide

 <400> 69
 ggggtcagtc gtgacggg 19

 <210> 70
 <211> 6
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide

 <221> misc_difference
 <222> (5)...(5)
 <223> y = t/u or c

 <400> 70
 gtcggt 6

 <210> 71
 <211> 8
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide

 <400> 71
 tcaacgtc 8

<210> 72	
<211> 8	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic Oligonucleotide	
<400> 72	
tcaacggtt	8
<210> 73	
<211> 8	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic Oligonucleotide	
<400> 73	
tcagcgct	8
<210> 74	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic Oligonucleotide	
<400> 74	
tcagcgtgcg cc	12
<210> 75	
<211> 8	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic Oligonucleotide	
<400> 75	
tcatcgat	8
<210> 76	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic Oligonucleotide	
<400> 76	
tccacgacgt ttctgacgtt	20
<210> 77	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide
 <400> 77
 tccataacgt tcctgatgct 20
 <210> 78
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide
 <400> 78
 tccatagcgt tcctagcgtt 20
 <210> 79
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide
 <400> 79
 tccatcacgt gcctgatgct 20
 <210> 80
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide
 <400> 80
 tccatgacgg tcctgatgct 20
 <210> 81
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide
 <400> 81
 tccatgacgt ccctgatgct 20
 <210> 82
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide
 <400> 82
 tccatgacgt gcctgatgct 20

<210> 83
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide

 <400> 83
 tccatgacgt tcctgacgtt 20

 <210> 84
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide

 <400> 84
 tccatgacgt tcctgatgct 20

 <210> 85
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide

 <400> 85
 tccatgccgg tcctgatgct 20

 <210> 86
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide

 <400> 86
 tccatgcgtg cgtgcgtttt 20

 <210> 87
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide

 <400> 87
 tccatgcgtt gcgttgcgtt 20

 <210> 88
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

```

<220>
<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 88
tccatggcgg tcctgatgct 20

<210> 89
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 89
tccatgtcga tcctgatgct 20

<210> 90
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 90
tccatgtcgc tcctgatgct 20

<210> 91
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 91
tccatgtcgg tcctgacgca 20

<210> 92
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 92
tccatgtcgg tcctgatgct 20

<210> 93
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 93

```

tccatgtcgg tcctgctgat	20
<210> 94 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> Synthetic Oligonucleotide <400> 94	
tccatgtcgt ccctgatgct	20
<210> 95 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> Synthetic Oligonucleotide <400> 95	
tccatgtcgt tcctgtcggt	20
<210> 96 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> Synthetic Oligonucleotide <400> 96	
tccatgtcgt ttttgtcggt	20
<210> 97 <211> 19 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> Synthetic Oligonucleotide <400> 97	
tcctgacggt cctgacggt	19
<210> 98 <211> 19 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> Synthetic Oligonucleotide <400> 98	
tcctgtcggt cctgtcggt	19
<210> 99 <211> 20 <212> DNA	

<213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide
 <400> 99
 tcctgtcggt ccttgcgtt 20
 <210> 100
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide
 <400> 100
 tcctgtcggt ttttgcgtt 20
 <210> 101
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide
 <400> 101
 tcctgtcggt tcctgtcggt 20
 <210> 102
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic oligonucleotide
 <400> 102
 tcgtcggtgt ctcccttct t 21
 <210> 103
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide
 <400> 103
 tcgtcggtgt ctgcccttct t 21
 <210> 104
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 104 tcgtcgtgtggt tgcgtttct t	21
<210> 105 <211> 14 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> Synthetic Oligonucleotide	
<400> 105 tcgtcgtcgt cggt	14
<210> 106 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> Synthetic Oligonucleotide	
<400> 106 tcgtcgttgt cgtgtcgtt	20
<210> 107 <211> 22 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> Synthetic Oligonucleotide	
<400> 107 tcgtcgttgt cgttttgcg tt	22
<210> 108 <211> 24 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> Synthetic Oligonucleotide	
<400> 108 tcgtcgtttt gtcgttttgcg cggt	24
<210> 109 <211> 17 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> Synthetic Oligonucleotide	
<400> 109 tctcccagcg ggcgcgt	17
<210> 110 <211> 18	

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide
 <400> 110
 tctcccagcg tgcgccat 18
 <210> 111
 <211> 8
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide
 <400> 111
 tcttcgaa 8
 <210> 112
 <211> 8
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide
 <400> 112
 tcttcgat 8
 <210> 113
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide
 <400> 113
 tgtcgttgtc gtt 13
 <210> 114
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide
 <400> 114
 tgtcgttgtc gttgctt 19
 <210> 115
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 115	
tgtcgttgtc gttgctgttg tcgtt	25
<210> 116	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic Oligonucleotide	
<400> 116	
tgtcgtttgt cgtttgtcgt t	21
<210> 117	
<211> 7	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic Oligonucleotide	
<221> misc_difference	
<222> (6)...(6)	
<223> y = t/u or c	
<400> 117	
tgtcgyt	7
<210> 118	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic Oligonucleotide	
<400> 118	
atggaagggtc caagggggtc	20
<210> 119	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic Oligonucleotide	
<400> 119	
atggaagggtc caggggggtc	20
<210> 120	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic Oligonucleotide	

<400> 120	
atggaaggtc cggggttctc	20
<210> 121	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic Oligonucleotide	
<400> 121	
atggactctc cggggttctc	20
<210> 122	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic Oligonucleotide	
<400> 122	
atggactctg gagggggctc	20
<210> 123	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic Oligonucleotide	
<400> 123	
atggactctg gaggggtctc	20
<210> 124	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic Oligonucleotide	
<400> 124	
atggactctg gggggttctc	20
<210> 125	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic Oligonucleotide	
<400> 125	
atggaggctc catggggctc	20
<210> 126	
<211> 20	

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide
 <400> 126
 gagaaggggc cagcactgat 20
 <210> 127
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide
 <400> 127
 gagaaggggg gaccttccat 20
 <210> 128
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide
 <400> 128
 gagaaggggg gaccttggat 20
 <210> 129
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide
 <400> 129
 gcatgagggg gagct 15
 <210> 130
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide
 <400> 130
 gctagaggga gtgt 14
 <210> 131
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 131 gctagagggg agggg	15
<210> 132 <211> 15 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> Synthetic Oligonucleotide	
<400> 132 gctagatggt agggg	15
<210> 133 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> Synthetic Oligonucleotide	
<400> 133 gggggacgat cgtcggggg	20
<210> 134 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> Synthetic Oligonucleotide	
<400> 134 gggggggggg gggggggggg	20
<210> 135 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> Synthetic Oligonucleotide	
<400> 135 ggggtcaacg ttgagggggg	20
<210> 136 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> Synthetic Oligonucleotide	
<400> 136 ggggtcgacg tcgagggggg	20
<210> 137	

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide

 <400> 137
 tccatcgagg gcctgatgct 20

 <210> 138
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide

 <400> 138
 tccatgaggg gcctgatgct 20

 <210> 139
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide

 <400> 139
 tccatgcggg tggggatgct 20

 <210> 140
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide

 <400> 140
 tccatggggg tcctgatgct 20

 <210> 141
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide

 <400> 141
 tccatggggt ccctgatgct 20

 <210> 142
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>

<223> Synthetic	Oligonucleotide	
<400> 142		
tccatggggt gcctgatgct		20
<210> 143		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Synthetic Oligonucleotide		
<400> 143		
tccatggggt tcctgatgct		20
<210> 144		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Synthetic Oligonucleotide		
<400> 144		
tccatgtggg gcctgatgct		20
<210> 145		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Synthetic Oligonucleotide		
<400> 145		
tccatgtggg gcctgctgat		20
<210> 146		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Synthetic Oligonucleotide		
<400> 146		
tccatgtggg tggggatgct		20
<210> 147		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Synthetic Oligonucleotide		
<221> misc_feature		
<222> (1)...(24)		
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.		

<400> 147
 tcgtcggtttt gtcggtttgt cggt 24

 <210> 148
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide

 <221> misc_feature
 <222> (1)...(2)
 <223> Backbone has phosphorothioate linkages.

 <221> misc_feature
 <222> (3)...(14)
 <223> Backbone has phosphodiester linkages.

 <221> misc_feature
 <222> (15)...(20)
 <223> Backbone has phosphorothioate linkages.

 <221> misc_feature
 <222> (21)...(21)
 <223> Backbone has phosphodiester linkages.

 <221> misc_difference
 <222> (2)...(2)
 <223> m = a or c

 <221> misc_difference
 <222> (18)...(18)
 <223> m = a or c

 <400> 148
 gmgtcaacg ttgagggmgt g 21

 <210> 149
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide

 <221> misc_feature
 <222> (1)...(2)
 <223> Backbone has phosphorothioate linkages.

 <221> misc_feature
 <222> (3)...(14)
 <223> Backbone has phosphodiester linkages.

 <221> misc_feature
 <222> (15)...(19)
 <223> Backbone has phosphorothioate linkages.

 <221> misc_feature

```

<222> (20)...(20)
<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<400> 149
ggggagttcg ttgagggggg                                20

<210> 150
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Oligonucleotide

<221> misc_feature
<222> (1)...(2)
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<221> misc_feature
<222> (3)...(14)
<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<221> misc_feature
<222> (15)...(19)
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<221> misc_feature
<222> (20)...(20)
<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<400> 150
gggggagcat gctcggggg                                20

<210> 151
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Oligonucleotide

<221> misc_feature
<222> (1)...(2)
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<221> misc_feature
<222> (3)...(14)
<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<221> misc_feature
<222> (15)...(19)
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<221> misc_feature
<222> (20)...(20)
<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<400> 151
ggggtcaagc ttgagggggg                                20

```

```

<210> 152
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Oligonucleotide

<221> misc_feature
<222> (1)...(20)
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<400> 152
ggggacgtcg acgtgggggg                                     20

<210> 153
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Oligonucleotide

<221> misc_feature
<222> (1)...(22)
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<400> 153
ggggtcgttc gaacgagggg gg                                   22

<210> 154
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Oligonucleotide

<221> misc_feature
<222> (1)...(22)
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<400> 154
ggggacgttc gaacgtgggg gg                                   22

<210> 155
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Oligonucleotide

<221> misc_feature
<222> (1)...(2)
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<221> misc_feature
<222> (3)...(14)
<223> Backbone has phosphodiester linkages.

```

```

<221> misc_feature
<222> (15)...(19)
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<221> misc_feature
<222> (20)...(20)
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<400> 155
gggggagcat gctggggggg                                20

<210> 156
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Oligonucleotide

<221> misc_feature
<222> (1)...(2)
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<221> misc_feature
<222> (3)...(15)
<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<221> misc_feature
<222> (16)...(20)
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<221> misc_feature
<222> (21)...(21)
<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<400> 156
gggggtcaac gttgaggggg g                                21

<210> 157
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Oligonucleotide

<221> misc_feature
<222> (1)...(2)
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<221> misc_feature
<222> (3)...(14)
<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<221> misc_feature
<222> (15)...(19)
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<221> misc_feature

```

```

<222> (20)...(20)
<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<400> 157
gggggatgat tgttgggggg                                     20

<210> 158
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Oligonucleotide

<221> misc_feature
<222> (1)...(2)
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<221> misc_feature
<222> (3)...(14)
<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<221> misc_feature
<222> (15)...(19)
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<221> misc_feature
<222> (20)...(20)
<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<221> modified_base
<222> (7)...(7)
<223> n = 5- methylcytidine

<221> modified_base
<222> (10)...(10)
<223> n = 5-methylcytidine

<400> 158
ggggggangan tgttgggggg                                     20

<210> 159
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Oligonucleotide

<221> misc_feature
<222> (1)...(2)
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<221> misc_feature
<222> (3)...(14)
<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<221> misc_feature
<222> (15)...(19)
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

```

```

<221> misc_feature
<222> (20)...(20)
<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<400> 159
gggggagcta gcttggggggg                                20

<210> 160
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Oligonucleotide

<221> misc_feature
<222> (1)...(2)
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<221> misc_feature
<222> (3)...(14)
<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<221> misc_feature
<222> (15)...(19)
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<221> misc_feature
<222> (20)...(20)
<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<400> 160
gggtcgtcgt cgtggggggg                                20

<210> 161
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Oligonucleotide

<221> misc_feature
<222> (1)...(2)
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<221> misc_feature
<222> (3)...(14)
<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<221> misc_feature
<222> (15)...(19)
<223> Backbone has phosphorothioate linkages.

<221> misc_feature
<222> (20)...(20)
<223> Backbone has phosphodiester linkages.

<400> 161

```

ggggacgtcg tcgtgggggg 20
 <210> 162
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide
 <221> misc_feature
 <222> (1)...(2)
 <223> Backbone has phosphorothioate linkages.
 <221> misc_feature
 <222> (3)...(14)
 <223> Backbone has phosphodiester linkages.
 <221> misc_feature
 <222> (15)...(19)
 <223> Backbone has phosphorothioate linkages.
 <221> misc_feature
 <222> (20)...(20)
 <223> Backbone has phosphodiester linkages.
 <400> 162
 ggggaaccgc ggttgggggg 20
 <210> 163
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide
 <400> 163
 accgatgacg tcgccggtga cggcaccacg acggccaccg tgctg 45
 <210> 164
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide
 <400> 164
 accgatgacg tcgccggtga cggcaccacg 30
 <210> 165
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide
 <400> 165
 gggggggggg ggaacgttg gggggggggg 30

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、磁性ビーズおよびフローサイトメトリーを用いて行われたIPCの単離および特徴付けの間の細胞集団のFACS分析を示す。左から右に以下が示される：PBMCからのlin⁻/MHCクラスII⁺細胞の選択；lin⁻/CD4⁺/MHCクラスII⁺細胞からのCD123⁺/MHCクラスII⁺細胞のさらなる選択；および新しく単離されたlin⁻/CD4⁺/MHCクラスII⁺/CD123⁺IPCのCD80⁻としての特徴付け。

【図2】

図2は、選択された増殖因子および刺激の存在下で、2日間インキュベートした後、新しく単離されたIPCの生存および活性化（CD80）のFACS分析を表す。各々のパネルに対する増殖因子（GM-CSF）および/または刺激物質（CpGオリゴヌクレオチドまたはLPS）は以下である：上段左は、なし；上段中央は、CpGオリゴヌクレオチド；上段右は、LPS；下段左は、GM-CSF；ならびに下段中央は、GM-CSFおよびCpGオリゴヌクレオチド。各々のパネルの右上隅の数字は、CD80についての平均蛍光強度（MFI）である。5つの独立した実験結果が示されている。

【図3】

図3は、新しく単離されたIPCの生存および活性化に対するCpGおよびポリICが有する異なる影響を示すFACS分析を示す。すべての細胞は、IL-3の存在下で、3日間培養された。次いで、細胞は以下を添加してさらに24時間培養された：なし（左のパネル）；CpG（中央のパネル）；またはポリIC（右のパネル）。CD80についてのMFIは、下段のパネルの各々の右上に示される。結果は、3つの独立した実験を代表する。

【図4】

図4は、CpGオリゴヌクレオチドと一緒に（黒塗りの棒）またはCpGオリゴヌクレオチドなし（白塗りの棒）のいずれかにおいて、IL-3およびGM-CSFの存在下で2日間培養したIPCの上清中に存在するIFN- α の濃度（IFN- α 特異性ELISAにより決定）を示すグラフである。結果は、3つの独

立した実験を代表する。

【図5】

図5は、 $3\mu\text{M}$ ODN 2006 ($n=7$)、1585 ($n=7$)、2197 ($n=6$)、2198 ($n=5$)の存在下で、またはODN ($n=7$)を添加しない培地中で48時間のインキュベーション後、異なるドナー由来のPBMCの上清中に誘導されたIFN- α の濃度を示すグラフである。エラーバーはSEMを示す。

【図6】

図6は、 $0.2\sim 12\mu\text{g/ml}$ の範囲の濃度のODN 2216、1585、2006、および2243の存在下で48時間培養したPBMCによるCpG ODN誘導IFN- α 合成の応答用量を表すグラフである。

【図7】

図7は、リポフェクチン ($10\mu\text{g/ml}$) の添加 ($n=3$) および非添加 ($n=4$) でプラズマ細胞様 (plasmacytoid) 突起細胞に対して富化されたPBMCにおけるIFN- α およびIFN- β 産生のCpG ODN媒介性刺激を示すグラフである。PBMCはIL-3単独 (ー) またはODN 2006、1585、2197または2216を添加したIL-3の存在下で48時間培養された。結果は、異なるドナーを用いる3または4の独立した実験の平均として表され、各々は2回実施された。エラーバーはSEMを示す。 $*p<0.0018$ (Bonferroni-Dunn補正)

【図8】

図8は、細胞内IFN- α を試験する4つのFACS実験の結果を示す4つの一連のグラフである。パネルAは、 lin^+ および lin^- 細胞の同定である。パネルBは、 lin^- 細胞における $\text{CD}123^{+/-}/\text{HLA-DR}^{++}\text{mDC}$ (ゲートII) および $\text{CD}123^{++}/\text{HLA-DR}^{+}\text{pDC}$ (ゲートIII) の同定である。パネルCは、 lin^+ 細胞における細胞内IFN- α に対する染色の欠如である。パネルDは、 lin^- 細胞における細胞内IFN- α についての染色を表す。

【図9】

図9は、細胞内IFN- α （パネルA）、および異なるCpGオリゴヌクレオチド（2006、2216、両者とも3 μ g/ml）で刺激した後のlin-/HLA DR+プラズマ細胞様突起細胞前駆体細胞における細胞内IFN- α （パネルB）を試験する6つのFACS実験の結果を表す6つの一連のグラフである。インキュベーションの間にIFN- α に対し、ブレフェルدينAが添加された。MFIは、平均蛍光強度である。

【図10】

図10は、IL-3単独（-）または種々のCpG ODN（2006、1585、2197、または2216、各々3 μ g/ml）を伴うIL-3に対する応答におけるプラズマ細胞様突起細胞上のCD86発現を示すグラフである。結果は、異なるドナー由来の細胞を用いた3つの独立した実験の平均として表される。エラーバーは、SEMを示す。 $*p<0.0018$ （Bonferroni-Dunn補正）。

【図11】

図11は、プラズマ細胞様突起細胞のFACS精製（パネルA）ならびにODN 2216を伴うIL-3およびODN 2216を伴わないIL-3（パネルB）に対する応答における精製されたプラズマ細胞様細胞によるIFN- α およびIFN- β の分泌を表すグラフを示す。

【図12】

図12は、PBMCの、ODN 2216、1585、2006、2118、IL-2、または培地単独への曝露後のNK細胞媒介K562細胞の溶解を表す。

【図13】

図13は、IL-3単独（左）、CpGオリゴヌクレオチドを補充されたIL-3（中央）、またはポリICを補充されたIL-3（右）の存在下で2日間培養したIPCの上清中に存在するIL-8の濃度（IL-8特異的ELISAにより決定された）を示すグラフである。結果は、3つの独立した実験を代表する。

【図14】

図14は、非ペプチド性抗原であるイソペンテニルピロホスフェート（IPP）の存在または非存在下で、CpG ODN 2006、1585または2216への応答における $\gamma\delta$ T細胞によるIFN- γ 産生を示すグラフである。結果は、培地単独の場合を陰性コントロールとしたIFN- γ についての細胞内染色についての平均蛍光強度（MIF）に関して示される。データは、平均+SEMとして表される；*（ $p<0,01$ ）および**（ $p<0,001$ ）は、培地コントロールとCpG ODNとを比較し、そしてIPP単独とIPP+CpG ODNとを比較する対にした、サンプルに対するスチューデントのt-検定により計算されたp値を示す。

【図15】

図15は、非ペプチド性抗原であるイソペンテニルピロホスフェート（IPP）の存在または非存在下で、CpG ODN 2006、1585、または2216に応答した $\gamma\delta$ T細胞の増殖を表す1対のグラフである。パネルAは、1つの代表的な実験からの10日間にわたる $\gamma\delta$ T細胞の増殖速度論を示す。パネルBはIPP単独での刺激後、または異なるCpG ODNとの組み合わせを用いた刺激後の10日間の $\gamma\delta$ T細胞の増殖を示す。9と16との間のドナーが各々のODNに対して分析された。データは、IPP単独の場合と比較したx倍の増加として表される（平均+SEM）；*は $p<0,05$ を示す（IPP+CpG ODNに対するIPP）。

【図16】

図16は、I型IFNおよび種々のCpG ODNによるCD40誘導IL-12p70産生の調節を示すグラフである。データは、抗CD40単独（平均=143pg/ml）によるIL-12p70産生のx倍として示され、そして3つの異なるドナーの平均+SEMを表す。

【図17】

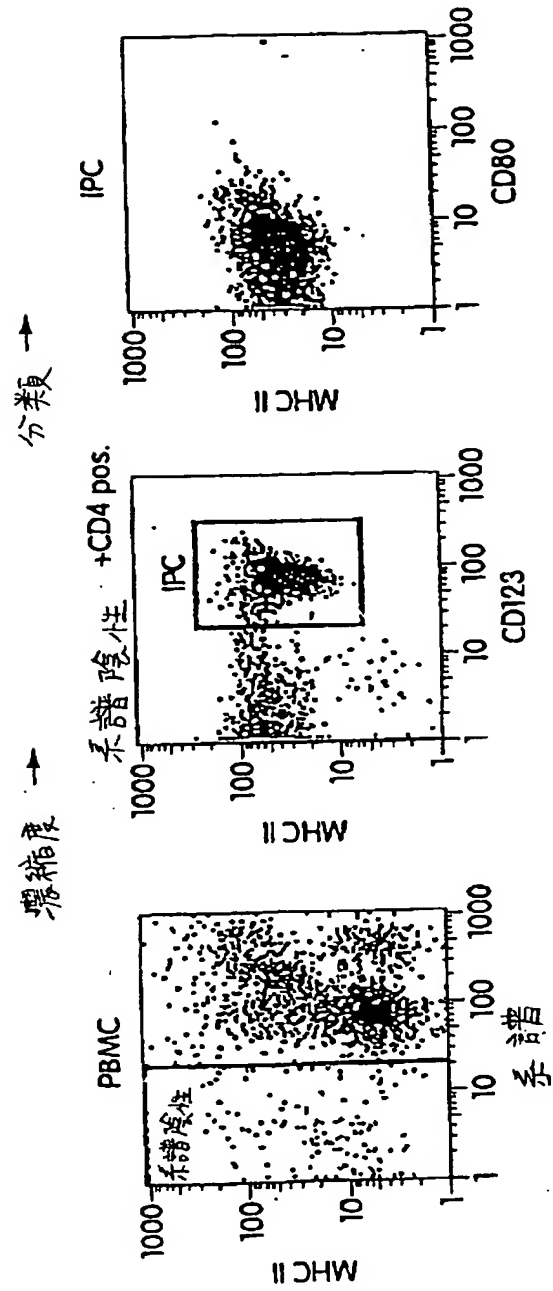
図17は、リコールおよび主要なペプチド特異性ヒトCTL応答に対するCpG ODN 2006、1585および2216の効果を示す一連のグラフである。パネルAおよびCは、ペプチド特異的IFN- γ 産生CTLを、リコール（recall）抗原であるインフルエンザマトリックスペプチドおよび主要な

抗原であるmelan-A/mart-1ペプチドの各々についての全てCD8⁺T細胞のパーセンテージとして示す。パネルBおよびDはそれぞれ、リコール抗原インフルエンザマトリックスペプチドおよび主要な抗原melan-A/mart-1ペプチドに対する抗原特異的テトラマー陽性染色CD8⁺T細胞である。

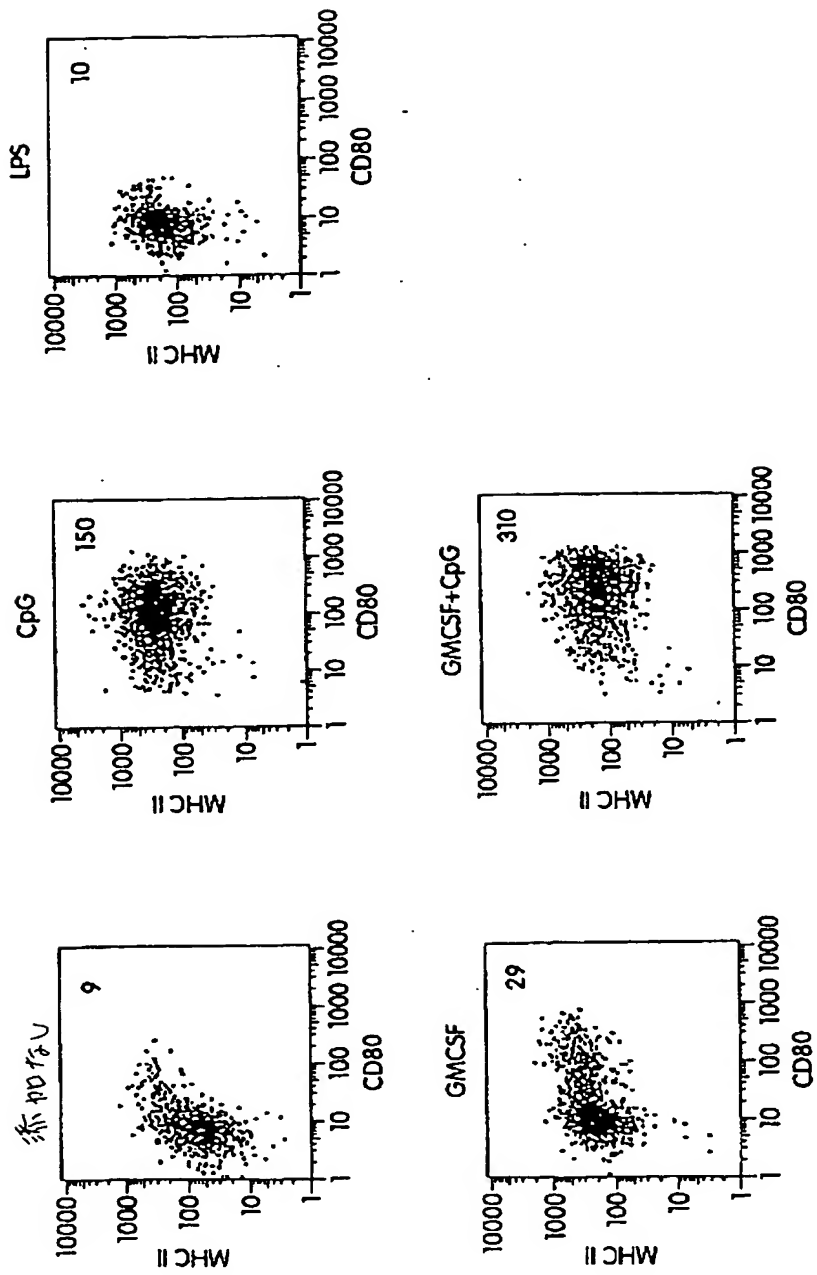
【図18】

図18は、容認される最大用量(MID)の少なくとも約10%より少ない量のIFN- α を含む組成物を含む容器を備え、そしてその同じ容器または別の容器にISNAを含むキットの代表的な該略図である。キットはまた、IFN- α での処置に対して感受性の状態の被験体を処置するための説明書を含み得る。

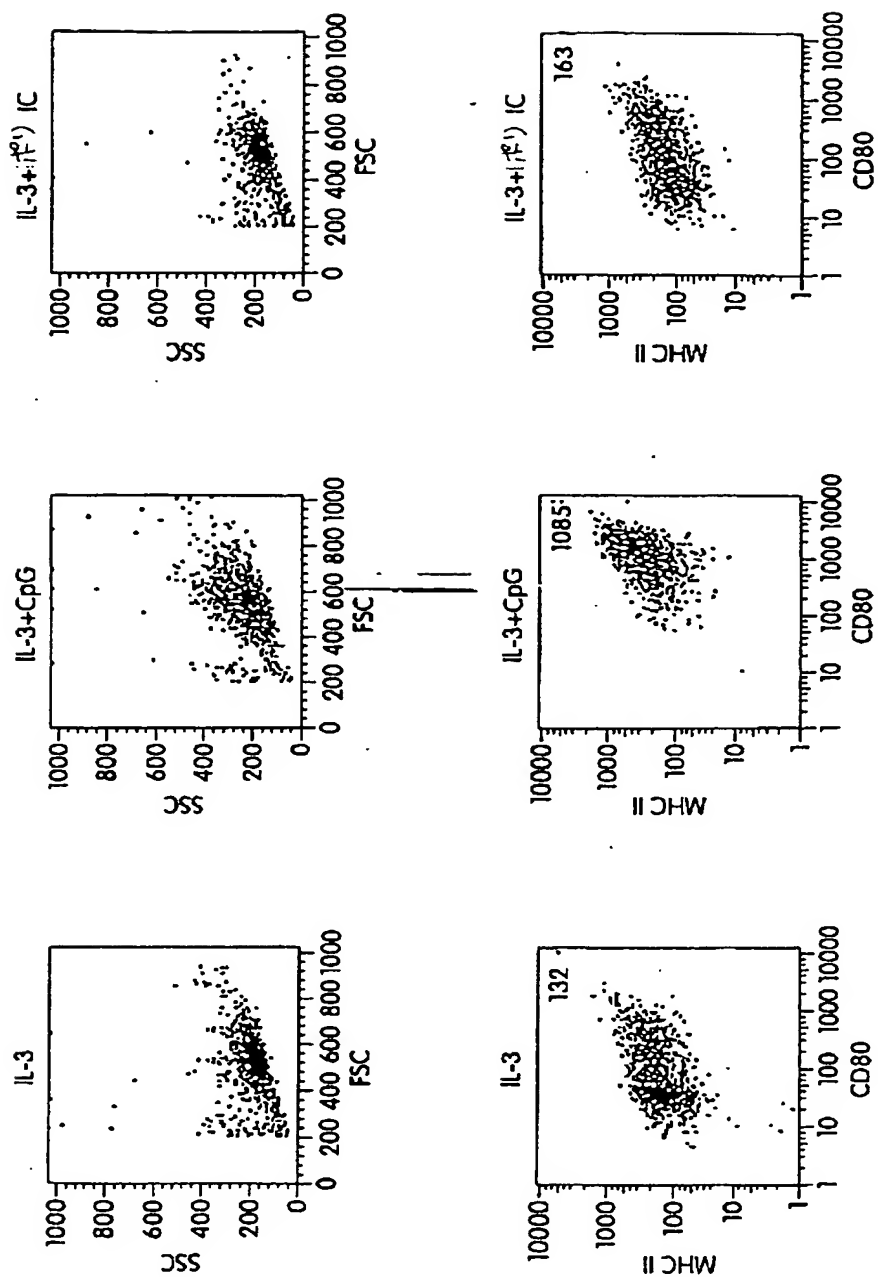
【図1】



【図2】



【図3】



【図4】

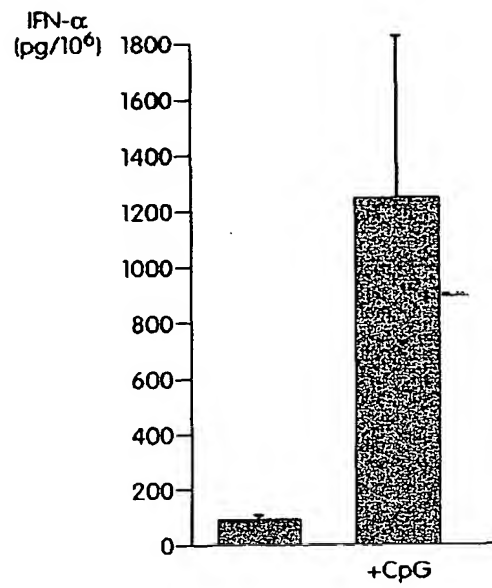


Fig. 4

【図5】

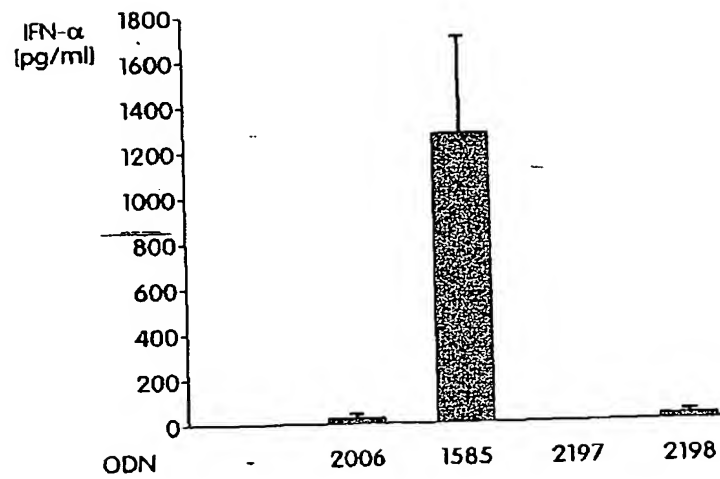


Fig. 5

【図6】

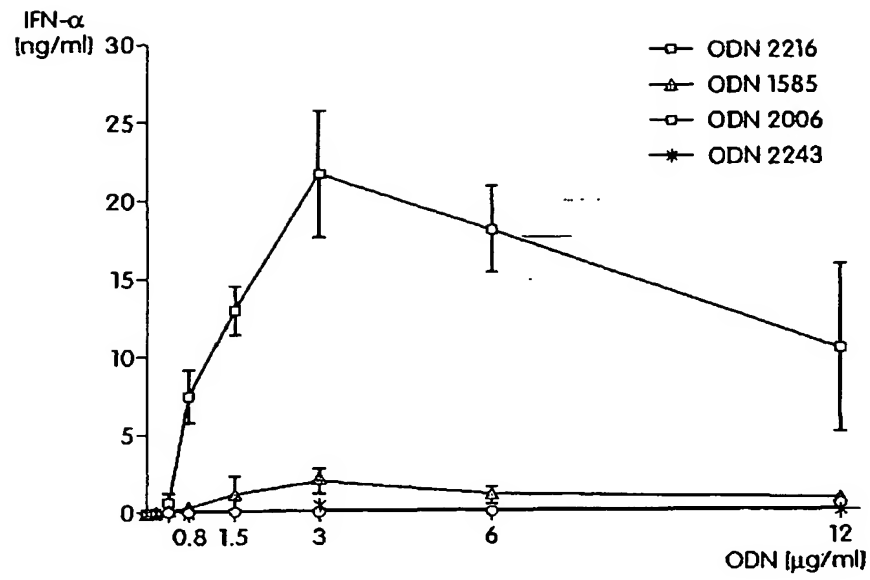
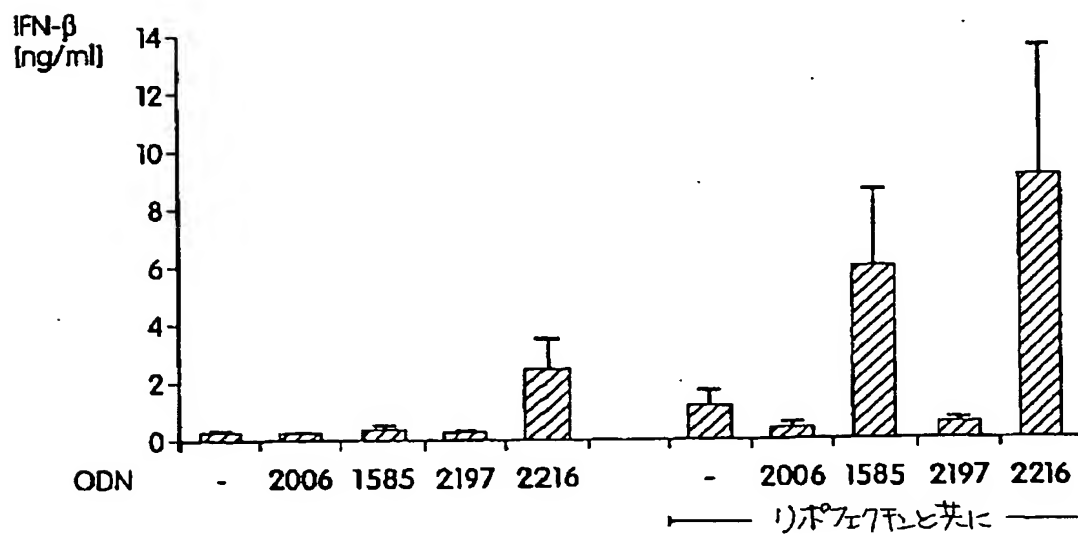
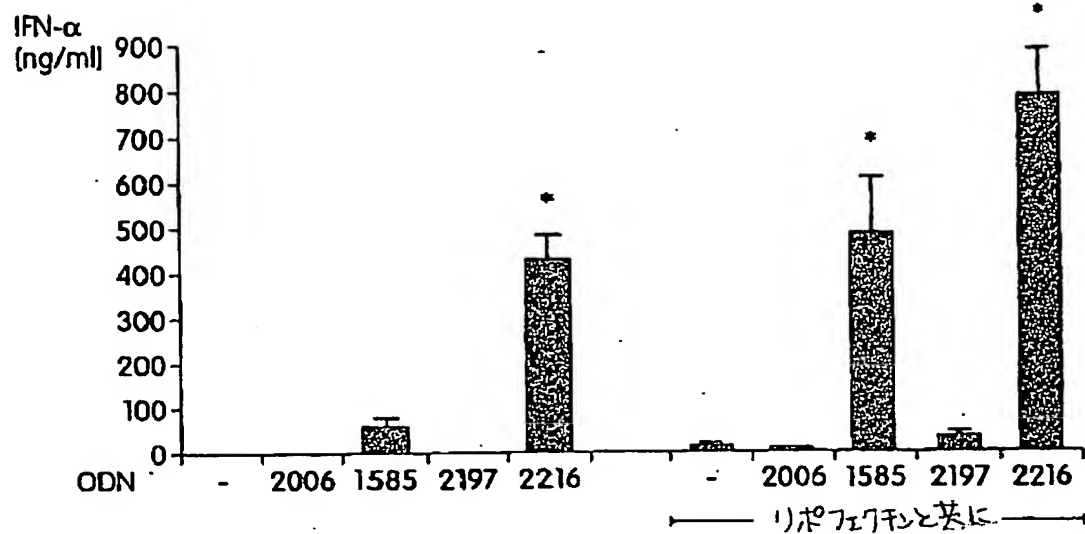


Fig. 6

【図7】



【図8】

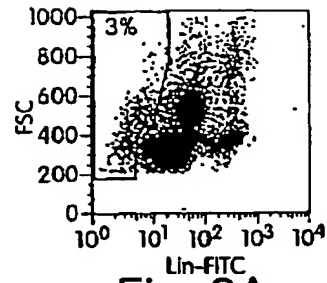


Fig. 8A

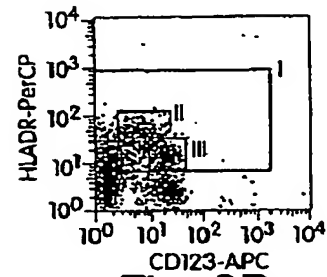


Fig. 8B

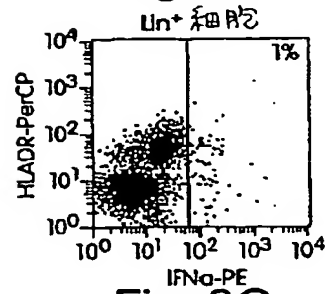


Fig. 8C

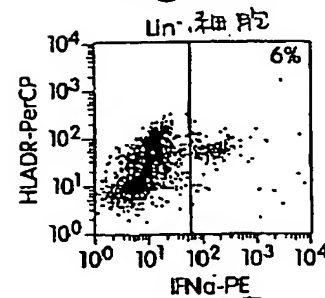


Fig. 8D

【图9】

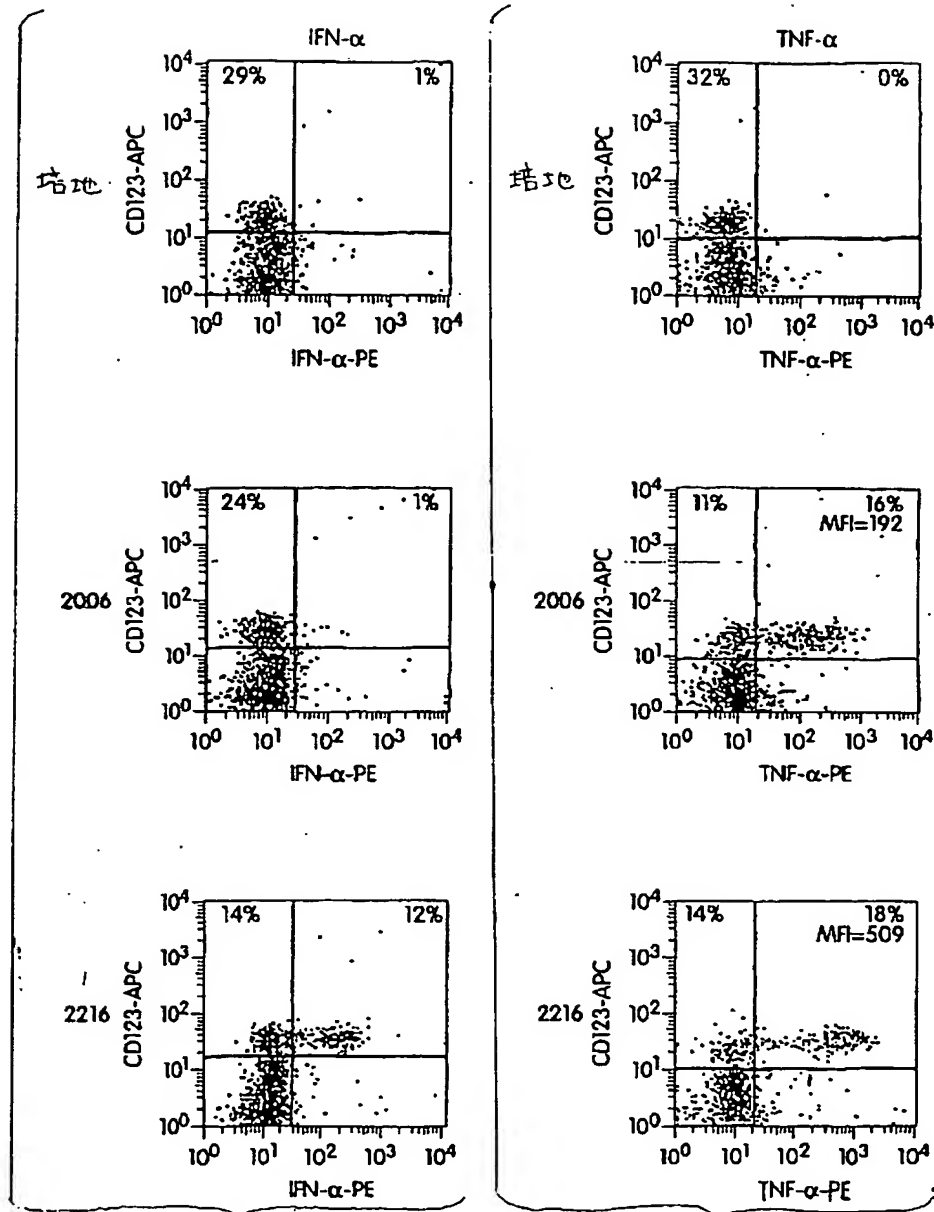


Fig. 9A

Fig. 9B

【図10】

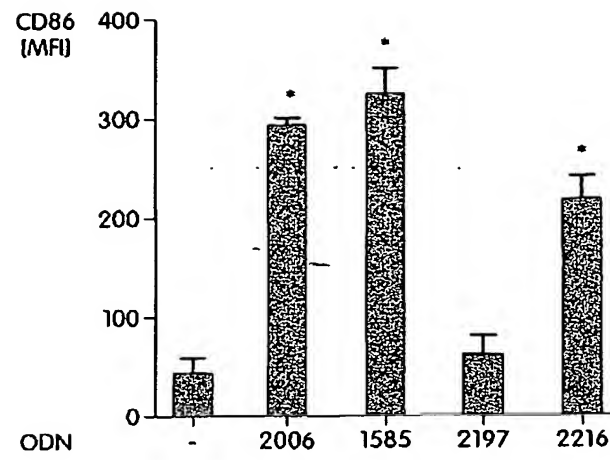


Fig. 10

【図11】

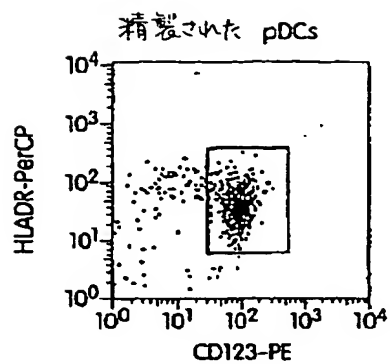


Fig. 11A

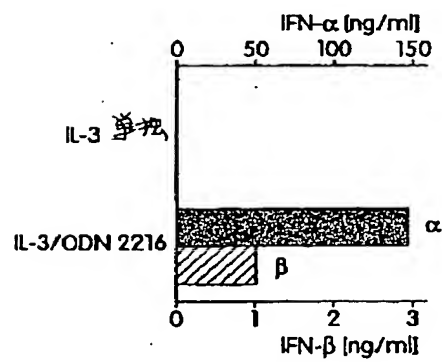
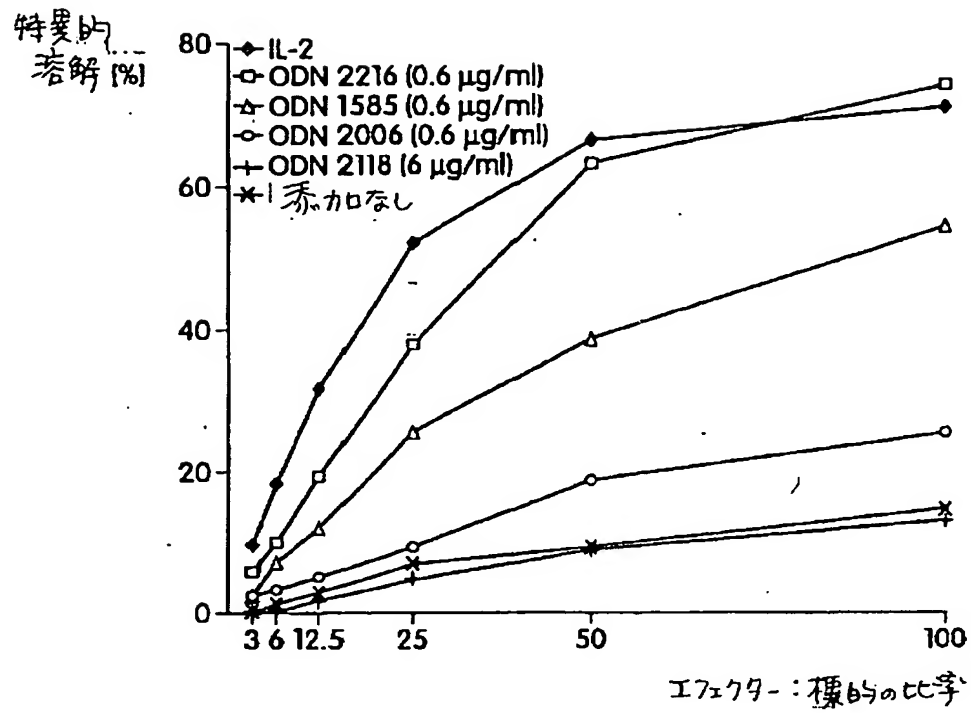
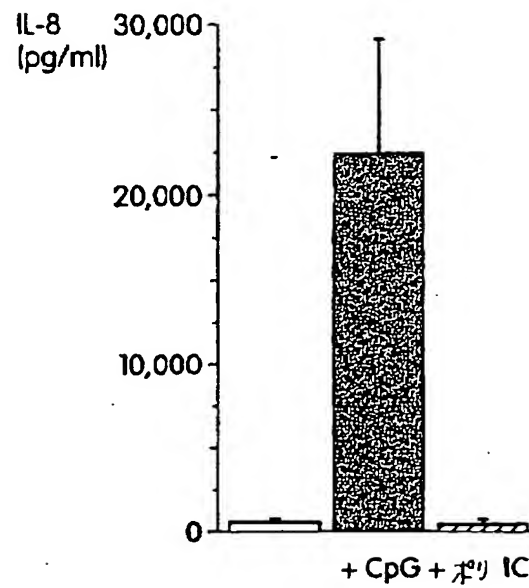


Fig. 11B

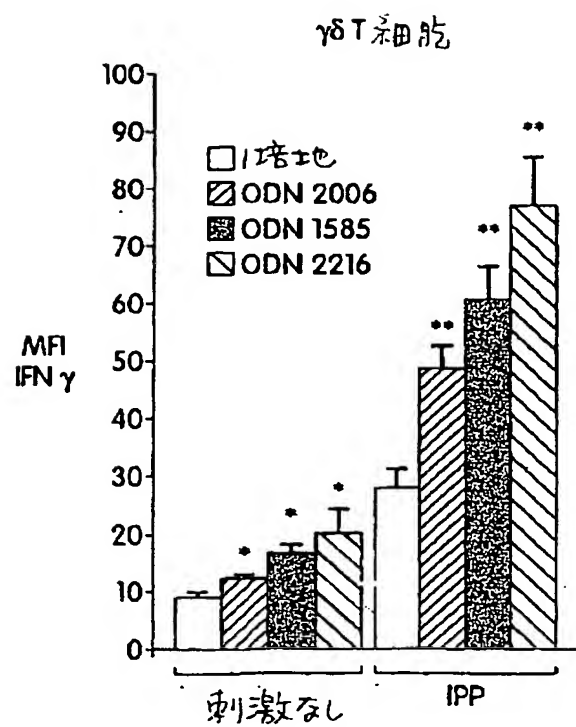
【図12】



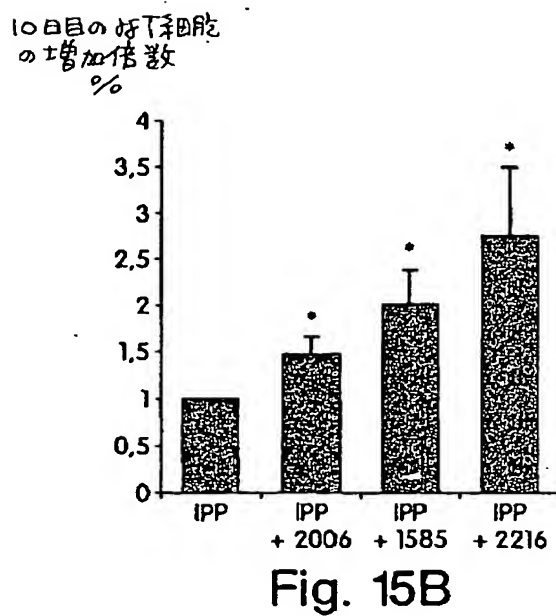
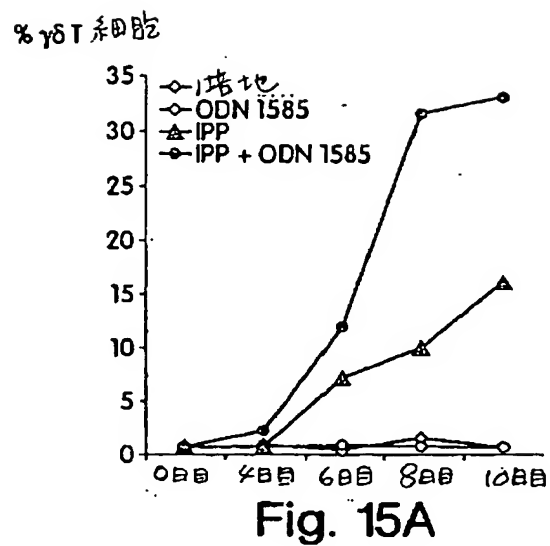
【図13】



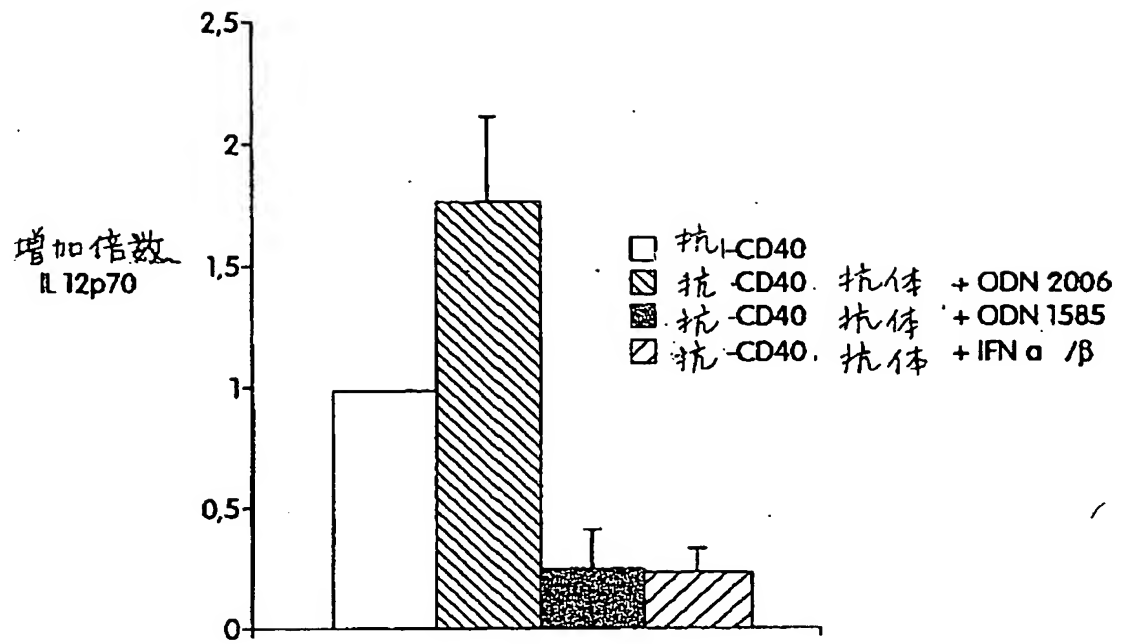
【図14】



【図15】



【图16】



【図17A・B】

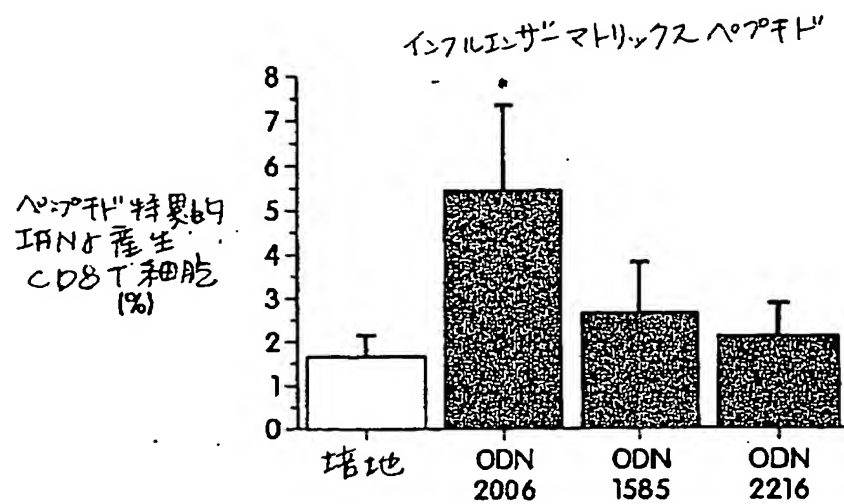


Fig. 17A

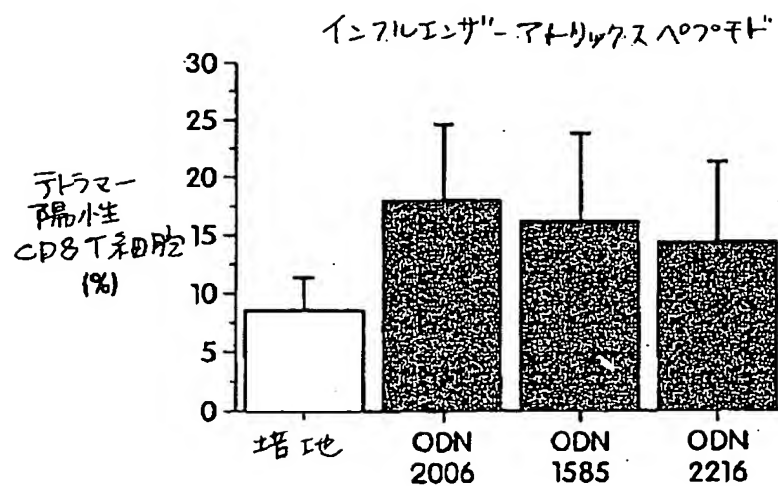


Fig. 17B

【図17C・D】

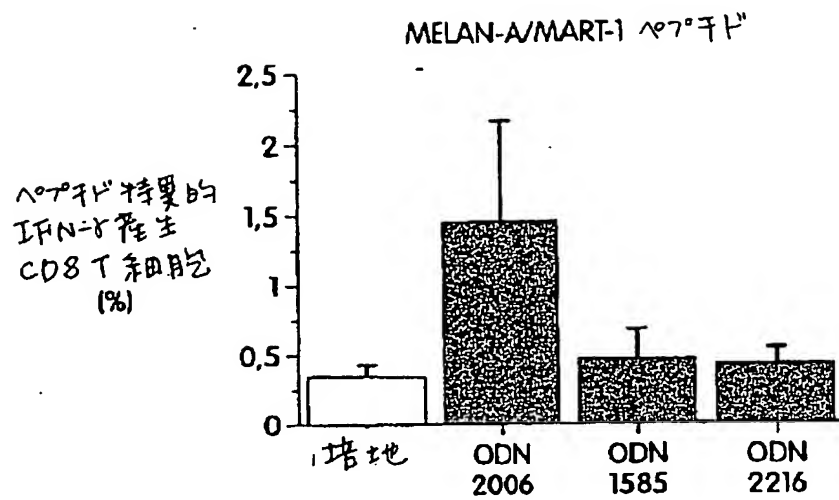


Fig. 17C

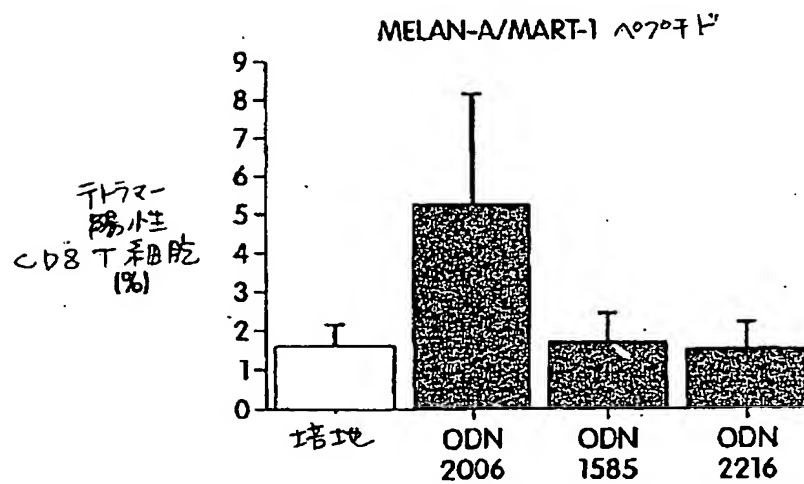


Fig. 17D

【図18】

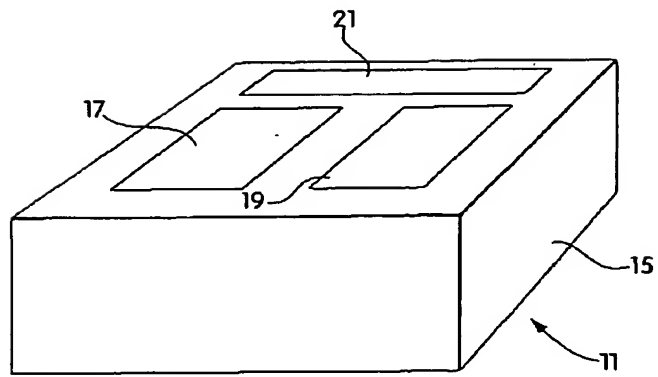


Fig.18

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US 00/26527	
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K38/21 A61K35/28 C12N5/08 A61P35/00 //(A61K38/21, 31:7088),(A61K38/21,31:7088,38:19)	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC	
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61K C12N	
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched	
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, STRAND, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, CANCERLIT, CHEM ABS Data, EMBASE, SCISEARCH	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages Relevant to claim No.
X	HARTMANN G ET AL: "CPG DNA: A POTENT SIGNAL FOR GROWTH, ACTIVATION, AND MATURATION OF HUMAN DENDRITIC CELLS" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, US, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, vol. 96, August 1999 (1999-08), pages 9305-9310, XP000919153 ISSN: 0027-8424 the whole document
Y	47-64, 143, 145-159, 161-178, 180-198 144, 160, 179
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.	
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.	
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "A" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 27 March 2001	Date of mailing of the international search report 09/04/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax (+31-70) 340-3016	Authorized officer Stein, A

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

page 1 of 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Int. Appl. No.
PCT/US 00/26527

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CELLA MARINA ET AL: "Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon." NATURE MEDICINE, vol. 5, no. 8, August 1999 (1999-08), pages 919-923, XP002164016 ISSN: 1078-8956 the whole document	144, 160, 179
X	WO 98 52581 A (WU TONG ;DAVIS HEATHER L (CA); OTTAWA CIVIC HOSPITAL LOEB RES (CA)) 26 November 1998 (1998-11-26) the whole document, especially page 3 lines 9-14, page 29 lines 17-25, page 64 lines 11 and 18	201, 202
X	WO 98 18810 A (UNIV IOWA RES FOUND ;KLINE JOEL N (US); KRIEG ARTHUR M (US)) 7 May 1998 (1998-05-07) cited in the application the whole document, especially page 64 line 3-page 66 line 17, example 13	201, 202
A	WO 98 33517 A (FOSTER GRAHAM RUSSELL ;THOMAS HOWARD CHRISTOPHER (GB); IMPERIAL CO) 6 August 1998 (1998-08-06) the whole document	1-46, 65-121
A	EP 0 855 184 A (HEEG KLAUS PROF DR ;LIPFORD GRAYSON B DR (DE); WAGNER HERMANN PROF) 29 July 1998 (1998-07-29) page 3, line 33 -page 5, line 33 claims 1-16	1-46, 65-121
A	CELLA MARINA ET AL: "Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA." JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 189, no. 5, 1 March 1999 (1999-03-01), pages 821-829, XP002164017 ISSN: 0022-1007 the whole document	47-64, 143-198
A	SIEGAL FREDERICK P ET AL: "The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood." SCIENCE (WASHINGTON D C), vol. 284, no. 5421, 11 June 1999 (1999-06-11), pages 1835-1837, XP002164018 ISSN: 0036-8075 the whole document	47-64, 143-198

-/-

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

page 2 of 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l. Application No.
PCT/US 00/26527

C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BARTHOLOME E J ET AL: "Interferon-beta induce the maturation of IL-12-deficient myeloid dendritic cells able to induce Th2 type cytokine secretion." JOURNAL OF INTERFERON AND CYTOKINE RESEARCH, vol. 19, no. SUPPL. 1, 1999, page S81 XP000990672 Meeting of the International Society for Interferon and Cytokine Research with the participation of the European Cytokine Society; Paris, France; September 5-9, 1999 ISSN: 1079-9907 the whole document	199,200
P,X	WO 99 51259 A (UNIV IOWA RES FOUND) 14 October 1999 (1999-10-14) page 3, line 25 -page 5, line 20 page 7, line 25 -page 11, line 27 page 12, line 27 - line 29 page 31, line 22 -page 34, line 11 page 37, line 10 -page 40, line 23 page 50, line 4 -page 51, line 12 claims 1-20	1-203
P,X	WO 00 06588 A (CPG IMMUNOPHARMACEUTICALS INC ;UNIV IOWA RES FOUND (US)) 10 February 2000 (2000-02-10) page 3, line 30 -page 6, line 23 page 8, line 19 -page 24, line 16 page 37, line 6 - line 20 page 38, line 11 - line 24 claims 1-85	1-203

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

page 3 of 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int. National Application No

PCT/US 00/26527

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9852581 A	26-11-1998	AU 7690898 A EP 1003531 A	11-12-1998 31-05-2000
WO 9818810 A	07-05-1998	AU 5242498 A CN 1235609 A EP 0948510 A	22-05-1998 17-11-1999 13-10-1999
WO 9833517 A	06-08-1998	AU 5871698 A EP 1011713 A	25-08-1998 28-06-2000
EP 0855184 A	29-07-1998	AU 724325 B AU 6293498 A WO 9832462 A EP 0971736 A	14-09-2000 18-08-1998 30-07-1998 19-01-2000
WO 9951259 A	14-10-1999	AU 3467899 A EP 1067956 A	25-10-1999 17-01-2001
WO 0006588 A	10-02-2000	AU 5323899 A	21-02-2000

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7	識別記号	F I	テ-マ-コード (参考)
A 6 1 P	1/08	A 6 1 P	29/00
	1/16		31/12
	29/00		31/18
	31/12		31/22
	31/18		35/00
	31/22		35/02
	35/00		37/04
	35/02		43/00
	37/04		1 1 7
	43/00		1 2 1
	1 1 7	A 6 1 K	37/66
	1 2 1	C 1 2 N	5/00
		A 6 1 K	37/02
C 1 2 N	5/06		

(81) 指定国 EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72) 発明者 ハルトマン, グンター
ドイツ国 80336 ムニッヒ, ツィーム
センシュトラーセ 1, ルドウィグ-マ
キシミリアンズ-ユニバーシティ オブ
ムニッヒ, ディビジョン オブ クリニ
カル ファーマコロジー, デパートメン
ト オブ インターナル メディシン

(72) 発明者 ブラッツラー, ロバート エル.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ
02481, ウェレスリー, ウィリアム
ストリート-スイート 115 20, コー
リー ファーマシューティカル グルー
プ, インコーポレイテッド

(72) 発明者 クレイグ, アーサー
 アメリカ合衆国 アイオワ 52242, ア
 イオワ シティー, イーエム アールビ
 ー 540, デパートメント オブ イン
 ターナル メディシン, ユニバーシティ
 ー オブ アイオワ リサーチ ファウン
 デーション

F ターム (参考) 4B065 AA93X BA25 BD35 BD39
 CA44

4C084 AA02 AA03 AA06 AA07 AA13
 BA01 BA02 BA08 BA16 BA17
 BA18 BA19 CA25 CA53 CA56
 CA59 DA01 DA19 DA22 MA02
 MA66 NA05 NA14 ZA072
 ZA082 ZA662 ZA712 ZA752
 ZB032 ZB052 ZB112 ZB262
 ZB272 ZB332 ZC552

4C086 AA01 AA02 EA16 MA02 MA04
 NA05 NA06 NA14 ZA07 ZA08
 ZA66 ZA71 ZA75 ZB03 ZB05
 ZB09 ZB11 ZB26 ZB27 ZB33
 ZC55

4C087 AA01 AA02 AA03 BB63 BB64
 BB65 NA14 ZA07 ZA08 ZA66
 ZA71 ZA75 ZB03 ZB05 ZB11
 ZB26 ZB27 ZB33 ZC55